



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

TESIS DOCTORAL

**IDENTIFICACIÓN Y AISLAMIENTO
DE UNA SUBPOBLACIÓN DE
PROGENITORES GLIALES SOX2⁺ DE
LA SUSTANCIA BLANCA DE
CEREBRO HUMANO ADULTO**

JORGE OLIVER DE LA CRUZ

MADRID, 2013

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

FACULTAD DE MEDICINA



**IDENTIFICACIÓN Y AISLAMIENTO
DE UNA SUBPOBLACIÓN DE
PROGENITORES GLIALES SOX2⁺ DE
LA SUSTANCIA BLANCA DE
CEREBRO HUMANO ADULTO**

**REALIZADA POR: JORGE OLIVER DE LA CRUZ
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**DIRIGIDA POR: ÁNGEL AYUSO SACIDO
ROSARIO PERONA ABELLÓN**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

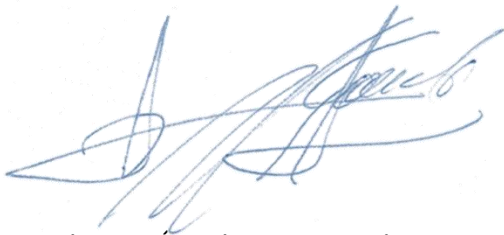
El Dr. Ángel Ayuso Sacido, Investigador del Centro Integral Oncológico Clara Campal (CIOCC) e Instituto de Medicina Molecular Aplicada (IMMA) (Fundación Hospital de Madrid).

La Dra. Rosario Perona Abellón, Investigadora del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, CSIC/UAM (Madrid)

Certifican:

Que la memoria de Tesis Doctoral realizada por D. Jorge Oliver De La Cruz, que lleva por título **“Identificación y aislamiento de una subpoblación de progenitores gliales SOX2⁺ de la sustancia blanca de cerebro humano adulto”** ha sido realizada en los laboratorios de la Fundación Hospital de Madrid en colaboración con el Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (CSIC/UAM).

Y para que así conste, firman la presente en Madrid a 8 de Enero de 2013.



Fdo: Dr. Ángel Ayuso Sacido



Fdo: Dra. Rosario Perona Abellón

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis, el Dr. Ángel Ayuso y la Dra. Rosario Perona, toda su dedicación, esfuerzo y apoyo a lo largo de este proyecto.

Al Dr. José Manuel García Verdugo, por animarme desde el inicio de mis estudios a dedicarme a la investigación, y por su interpretación de las imágenes de Microscopía Electrónica.

Al Dr. Antonio Gutiérrez, Jefe de Neurocirugía Funcional y Estereotáctica, por su implicación en este proyecto y creer en él tanto o más que yo. Y por supuesto, a todo el equipo médico, que me ha facilitado lo máximo posible la obtención de las muestras

Al Dr. Manuel Hidalgo y al Dr. Cristobal Belda, por su ayuda y colaboración en un momento tan complicado de mi periodo predoctoral.

Al Dr. López-Ríos, por su ayuda con el análisis automatizado de la proliferación celular.

A mis compañeros del extinto laboratorio de Morfología Celular, y todos los que han pasado por él. Mención especial merecen Pepa, que ha sido mi norte en muchas ocasiones; también la Dra. Carmen Escobedo y la Dra. Carolina Gandía, por sus inestimables consejos e inyecciones de moral; y a mis compañeras Arantxa, Minerva y Elisa, que han estado a mi lado y me han ayudado cuando lo he necesitado.

A la Dra. Deborah Burks y su laboratorio, por permitirme seguir este último año en el Centro de Investigación Príncipe Felipe. A la Dra. Consuelo Guerri y su laboratorio, en especial a la Dra. Rosa Guasch, por acogerme este último año y por facilitarme el trabajo todo lo que estaba a su alcance.

A las unidades de Citómica, Microscopia Confocal y Microscopía Electrónica del Centro de Investigación Príncipe Felipe por las facilidades brindadas para la realización de esta tesis, en especial a Alberto, Eva, y Mario.

A mis padres, mi hermana, mi perro Ron y mi familia en general, por su apoyo incondicional, tanto en los momentos buenos como en los duros. A mis abuelos, especialmente a mi abuelo Francisco, porque aunque ya no están, siempre me animaron a seguir estudiando, y sé que estarían orgullosos de este trabajo.

A Miguel Ángel, sin el cual probablemente me hubiera vuelto loco; y en general, a la familia Sáez-Soro al completo.

A mis amigos, en especial a Ana, Marcos, Maysi y Flexa, por devolverme los pies a tierra cuando era necesario, y no dejar que los problemas me absorbieran.

Y, sobre todo, muchas gracias a todos los pacientes que han colaborado en este proyecto y lo han hecho posible.

A mis padres

ÍNDICE

ÍNDICE

<u>ABREVIATURAS</u>	1
<u>RESUMEN</u>	7
<u>INTRODUCCIÓN</u>	13
1. ENFERMEDADES DESMIELINIZANTES.	
LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE	15
1.1. Los oligodendrocitos como diana de las enfermedades desmielinizantes y la esclerosis múltiple	16
1.2. Fisiopatología de la esclerosis múltiple	17
1.3. Tratamiento de la esclerosis múltiple	17
2. TERAPIA CELULAR	19
2.1. Células madre neurales adultas	20
2.1.1. Giro dentado (hipocampo).....	21
2.1.2. Zona subventricular	22
2.2. Células progenitoras de oligodendrocitos	24
2.2.1. Primeras descripciones: preoligodendrocitos O4 ⁺ y población A2B5 ⁺	26
2.2.2. Población PDGFRa ⁺	27
2.2.3. Población CNP ⁺	27
2.2.4. Población NG2 ⁺ y OLIG2 ⁺	28
2.2.5. Cultivo celular de células progenitoras	29
3. SOX2	30
3.1. Papel de SOX2 en las células madre embrionarias	30
3.2. Papel de SOX2 en el desarrollo	31
3.3. Papel de SOX2 en las células madre neurales adultas	32
<u>JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	35
<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	39
1. MATERIAL BIOLÓGICO	41
1.1. Muestras de sustancia blanca.....	41
1.2. Muestras de tumores gliales	41
2. ESTUDIO DE LAS MUESTRAS	41
2.1. Estudio por resonancia magnética.....	41
2.2. Estudio inmunohistoquímico	42
2.3. Recuento automatizado de células KI67 ⁺	42

3. TÉCNICAS <i>EX VIVO</i>.....	42
3.1. Aislamiento de células proliferantes	42
3.1.1 Optimización del protocolo de aislamiento	
de células proliferantes	43
3.2. Cultivos celulares humanos	43
3.2.1. Células en monocapa.....	43
3.2.2. Cultivo en esfera.....	44
3.2.2.1 Ensayo de generación de cultivos flotantes a	
partir de células en monocapa	44
3.3. Cultivos de líneas celulares comerciales	45
3.4. Cultivo de hibridoma para la producción de anticuerpo A2B5	45
3.5. Ensayos de diferenciación espontánea	46
4. TÉCNICAS <i>IN VITRO</i>	47
4.1. Citometría de flujo	47
4.2. Ensayo de B-galactosidasa asociada a senescencia.....	47
4.3. Inmunocitoquímica	48
4.3.1. Inmunocitoquímica general	48
4.3.2. Inmunocitoquímica <i>in vivo</i>	49
4.3.3. Inmunocitoquímica para el marcador Ki67	49
4.3.4. Adquisición de imágenes y cuantificación	49
4.4. Inmunohistoquímica	50
4.4.1 Seccionamiento del tejido	50
4.4.2 Inmunohistoquímica fluorescente	50
4.4.3 Adquisición de imágenes y cuantificación	51
4.5 Microscopia electrónica de transmisión.....	51
5. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES.....	52
5.1. Extracción de ARN y cuantificación	52
5.2. RT-PCR (PCR con transcripción inversa)	52
5.2.1. Síntesis de ADNc: Transcripción inversa.....	54
5.2.2. Diseño de cebadores y validación	54
5.2.3. Amplificación del ADNc (RT-PCR).....	55
5.2.4. Análisis del producto de la RT-PCR.....	55
5.3. PCR a tiempo real	55
5.4. Aislamiento de ADN y cuantificación	56
5.5. Hibridación genómica comparativa.....	56

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	57
 <u>RESULTADOS</u>	59
1. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DE LAS MUESTRAS QUIRÚRGICAS	61
2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS OBTENIDAS USANDO EL PROTOCOLO ESTÁNDAR	65
2.1. Aislamiento y cultivo primario de las células obtenidas con el protocolo estándar	65
2.2. Caracterización de las líneas primarias	66
2.2.1. Caracterización morfológica	66
2.2.2. Cuantificación de las células Ki67+ lo largo de los pases. Ensayo de senescencia	68
2.2.3. Análisis de la estabilidad genética	70
2.2.4. Caracterización molecular	71
2.2.4.1. Análisis de marcadores de célula madre	71
2.2.4.2. Análisis de marcadores de linaje neural	73
2.2.5. Caracterización inmunocitoquímica	75
3. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS USANDO UN PROTOCOLO OPTIMIZADO	77
3.1. Aislamiento y caracterización de las muestras obtenidas usando un protocolo optimizado	77
3.2. Caracterización de las células en esfera y adherentes	79
3.2.1. Análisis de la expresión de marcadores de indiferenciación	79
3.2.2. Análisis de la expresión de SOX2	80
3.2.2.1. Análisis por PCR a tiempo real	80
3.2.2.2. Análisis por inmunocitoquímica	81
3.2.3. Análisis de la expresión de marcadores de linaje neural	84
3.2.4. Análisis inmunofenotípico de marcadores de linaje glial	86
3.3. Diferenciación celular	87
3.3.1. Diferenciación espontánea de esferas	87
3.3.2. Ensayo de diferenciación hacia linaje oligodendroglial	89
 4. BÚSQUEDA DE CÉLULAS SOX2⁺ EN LA SUSTANCIA BLANCA HUMANA ADULTA	93
4.1. Obtención de controles positivos y puesta a punto	93
4.2. Inmunohistoquímica contra la proteína SOX2	96

4.3. Co-inmunotinción con marcadores de los diferentes linajes neurales.....	97
<u>DISCUSION</u>	101
<u>CONCLUSIONES</u>	115
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	119
<u>ANEXO</u>	137

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

- 3'UTR: *3' untranslated region*
- ABCG2: *ATP-binding cassette sub-family G member 2*
- ACTB: β - actina
- ADC: *Apparent diffusion coefficient* (coeficiente de difusión aparente)
- ADN: Ácido desoxirribonucléico
- ADNc: Ácido desoxirribonucléico complementario
- AF: Anisotropía fraccional (*fractional anisotropy*)
- ANOVA: *Analysis of variance* (análisis de varianzas)
- ARN: Ácido ribonucleico
- ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
- B2M: β -2-microglobulina
- bFGF: *basic fibroblast growth factor* (factor de crecimiento fibroblástico básico)
- BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool* (Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básico)
- BM1: B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog
- BMP: *Bone Morphogenetic Protein* (Proteínas morfogénicas óseas)
- BrdU: 5-Bromo-2'-deoxiruridina
- CGH: *Comparative Genomic Hybridation* (Hibridación genómica comparada)
- CNP, CNPasa: *2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase*
- CPOs: células progenitoras de oligodendrocitos.
- CPPs: *cell-penetrating peptides* (péptidos penetrantes en células)
- DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
- DCX: *Doublecortin* (doblecortina)
- DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
- DMSO: dimetilsulfoxido
- DNA: Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucléico)
- DNAsa I: Desoxirribonucleasa I
- DTI: *Diffusion tensor imaging* (imagen con tensor de difusión)
- EGF: *epidermal growth factor* (factor de crecimiento epidérmico)
- EM: Esclerosis Múltiple

EPI: echo-planar imaging (imagen ecoplanar)

FA: Fractional anisotropy (Anisotropía fraccional)

FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting (Separación celular por fluorescencia activada)

FGF4: fibroblast growth factor 4 (factor de crecimiento fibroblástico 4)

GalC: Galactosilceramidasa o galactocerebrosidasa

GAPDH: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

GFAP: Glial fibrillary acidic protein (Proteína ácida fibrilar glial)

HBSS: Hanks Balanced Salt Solution

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HMB: *high mobility box*

IBA1: ionized calcium binding adaptor molecule 1 (molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1)

IPSc: Induced Pluripotent Stem cells (células madre pluripotentes inducidas)

MACS: Magnetic Activated Cell Sorting (Separación celular por magnetismo)

MAG: Myelin-associated glycoprotein (Glicoproteína asociada a mielina)

MAP2: Microtubule-associated protein 2 (Proteína asociada a microtubules 2)

MBP: Myelin basic protein (Proteína de mielina básica)

MELK: Maternal embryonic leucine zipper kinase

miR302: micro ARN 302

MOG: Myelin oligodendrocyte protein (proteína de mielina de oligodendrocito)

MRI: Magnetic resonance imaging (Imagen por resonancia magnética)

MS: Multiple Sclerosis (Esclerosis Múltiple)

MSI1: Musashi 1

NES: Nestina

NeuN: Neuronal Nuclei (Núcleo Neuronal)

NeuroD: Neurogenic differentiation 1 (diferenciación neurogénica 1)

NG2: Chondroitin Sulfate Proteoglycan

NT3: Neurotrofina 3

O-2As: *oligodendrocytes or type-2 astrocytes* (precursor de oligodendrocito o astrocito tipo 2)

OCT 3/4: Octamer-binding transcription factor 3/4 (Factor de Transcripción de Unión a Octámeros 3/4)

OLIG1: *Oligodendrocyte transcription factor 1*

OLIG2: *Oligodendrocyte transcription factor 2*

OPCs: *Oligodendrocyte progenitor cells* (células progenitoras de oligodendrocitos)

GFP: *Green Fluorescent Protein* (proteína verde fluorescente)

PAX6: *Paired box gene 6*

PB: *Phosphate buffer* (tampon fosfato)

PBS: *Phosphate buffered saline* (tampón fosfato salino)

PCNA: *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (Antígeno nuclear de células en proliferación)

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa)

PDGF, PDGF α : *Platelet-derived growth factor (alpha)* (factor de crecimiento derivado de plaquetas (alfa))

PDGFR, PDGFRA: *Platelet-derived growth factor receptor (alpha)* (Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (alfa))

PFA: *Paraformaldehyde*

PIPES: *piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)*

PLP: *Myelin proteolipid protein*

PROM1: *Prominin 1*

PSA-NCAM: *Polysialylated-neural cell adhesion molecule* (Molécula de adhesión celular neural polisializada)

RT-PCR: *Reverse transcription polymerase chain reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa)

S-gal: *Senescence-associated beta-galactosidase* (galactosidasa beta asociada a senescencia)

SGZ: *Subgranular Zone* (Zona Subgranular)

SNC: *Sistema Nervioso Central*

SOX: *Sry-related HMG box*

SPSS: *Statistical Package for the Social Sciences*

SRY: *sex-determining region Y*

SVZ: *Subventricular Zone* (Zona Subventricular)

TE: *Echo Time*

TR: *Repetition Time*

TUBB3: β -3-tubulina

UV: *Ultravioleta*

VIM: Vimentina

WMPCs: White matter progenitor cells (células progenitoras de la sustancia blanca)

ZSG: Zona Subgranular

ZSV: Zona Subventricular

RESUMEN

RESUMEN

Un número importante de enfermedades neurodegenerativas cursan con pérdida de mielina, lo que las hace candidatas para el desarrollo de terapias de reemplazo celular. La movilización de células madre neurales y/o progenitores gliales, junto a su aislamiento, expansión *in vitro* y posterior implantación, han sido propuestas como las dos aproximaciones más prometedoras. En este sentido, se ha descrito la existencia de células madre neurales de la zona subventricular (ZSV) y la zona subgranular (ZSG), además de una población heterogénea de progenitores gliales en la sustancia blanca subcortical del cerebro humano adulto. Dentro de esta última población, hasta la fecha se han aislado subpoblaciones caracterizadas por la expresión de A2B5, PDGFR α o CNP. Así pues, en el presente trabajo se abordó el análisis de la diversidad de dicha población de progenitores gliales.

Por otro lado, SOX2, es un marcador de indiferenciación expresado en células embrionarias y durante el desarrollo del neuroectodermo y, en humanos, se ha descrito su expresión en células de la ZV en estadios fetales y en células de la ZSV y ZSG en el cerebro adulto. Además, es uno de los factores clave utilizados en técnicas de reprogramación celular.

Tras la optimización del protocolo de aislamiento de células madre/progenitoras neurales descrito en la bibliografía, identificamos, por primera vez una población de células SOX2⁺, capaz de generar *in vitro* oligodendrocitos O4⁺ y, en menor medida, astrocitos GFAP⁺. Posteriormente, identificamos la misma subpoblación SOX2⁺ en muestras de tejido de sustancia blanca humana adulta. Estas células no expresaban marcadores neuronales, microgliales o de oligodendrocito maduro y, únicamente colocalizaban con OLIG2 y, de forma aislada, con GFAP.

Los resultados obtenidos demuestran la existencia de una nueva subpoblación de progenitores gliales SOX2⁺ en sustancia blanca de cerebro humano adulto, con potencial para ser utilizada en técnicas de reprogramación celular y en el desarrollo de terapias de regeneración de tejido desmielinizado.

SUMMARY

A significant number of neurodegenerative diseases progresses with a loss of myelin, which makes them candidate diseases for the development of cell-replacement therapies. The mobilization of endogenous neural/glial progenitor cells, together with their isolation, *in vitro* expansion and further implantation, have been proposed as the two most promising approaches. In this sense, neural stem cells within the subventricular zone (SVZ) and the subgranular zone (SGZ), together with a pool of glial progenitor cells in the subcortical white matter have been described in the normal adult human brain. Within this last cell population, different subpopulations have been isolated according to their expression of A2B5, PDGFRA or CNP. In the present work we focused on the characterization of the glial progenitor cell heterogeneity.

SOX2 expression is linked to the undifferentiated state of stem cells in mammalian neurogenic niches. In developmental stages, this marker is expressed earlier in the differentiation process to glial cells, and its expression has been reported in human fetal VZ and adult SVZ and SGZ. In addition, it is one of the key reprogramming factors used to generate induced pluripotent stem cells.

After the optimization of the isolation protocol described in the bibliography, we have isolated, for the first time, a SOX2⁺ cell subpopulation capable of generating *in vitro* oligodendrocytes O4⁺, and, to a lesser extent, astrocytes GFAP⁺. Afterward, we have identified the same SOX2⁺ subpopulation in normal adult human white matter. These cells did not show co-localization with neuronal, microglial or mature oligodendrocyte markers, and only showed a high co-localization with the oligodendrocyte progenitor marker OLIG2, and, less frequently, with the astrocyte marker GFAP.

These results confirmed the existence of a new glial progenitor subpopulation in normal adult human white matter, with potential to be for the regeneration of the demyelinated tissue.

INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDADES DESMIELINIZANTES. LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Las enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central (SNC) son aquellas que cursan con una pérdida de mielina de la sustancia blanca del cerebro y médula espinal, dañando la conducción nerviosa y produciendo diferentes trastornos en función del área afectada. Se trata de un conjunto heterogéneo de enfermedades, clasificadas de acuerdo a sus manifestaciones clínicas y que en muchos casos tienen un origen desconocido (Hauser S.L., 2008) (**tabla 1**).

Tabla 1. Enfermedades desmielinizantes descritas

Enfermedades desmielinizantes
Esclerosis múltiple
Encefalomielitis aguda diseminada
Leucoencefalopatía multifocal progresiva
Mielinólisis pónica
Esclerosis concéntrica de Baló
Enfermedad de Marchiafava-Bignami

De todas ellas, por su incidencia en la población, destaca la **Esclerosis Múltiple (EM)**, en inglés *Multiple Sclerosis*, MS). La EM es una enfermedad neurodegenerativa, crónica y de carácter autoinmune que afecta al SNC (Noseworthy y col., 2000). Básicamente, la EM ataca los axones mielinizados del cerebro y/o médula espinal, destruyendo la mielina y, posteriormente, los axones en diversas escalas (Hafler, 2004).

La EM es la afección neurológica más frecuente entre los adultos jóvenes tras la epilepsia, siendo además la causa más frecuente de discapacidad neurológica en adultos jóvenes con la excepción de los traumatismos (desde la erradicación de la poliomielitis en los países occidentales). Tiene una prevalencia estimada de 83 afectados de cada 100.000 personas en Europa, y es el doble de frecuente en mujeres que en hombres. Se presenta generalmente cuando los pacientes tienen entre 20 y 45 años, aunque también hay formas que aparecen durante la infancia o a edades avanzadas (Koch-Henriksen y Sorensen, 2010; Pflieger y col., 2010). La evolución de la EM es altamente variable e impredecible. En la mayoría de pacientes se caracteriza inicialmente por episodios de déficits neurológicos reversibles que a menudo son seguidos por deterioro neurológico progresivo. Como consecuencia, en los casos más severos lleva a una movilidad reducida e invalidez.

La EM es considerada un desorden autoinmune órgano-específico (Giovannoni y Ebers, 2007). Si bien la causa que desencadena el inicio de la enfermedad es desconocida, parece poco probable que se trate de un único evento causativo, dado que se han encontrado asociaciones con ciertos factores de riesgo hereditarios (Kurtzke y col., 1979; Kurtzke, 1980; Robinson y Kindt, 1992; Hockertz y col., 1998; Mycko y col., 1998; Kantarci y col., 2003; Willer y col., 2003; Watson y col., 2011) y ambientales (Acheson y col., 1960; Dean, 1967; Kurtzke, 1980; Hammond y col., 1988; Dean y Elian, 1997; van der Mei y col., 2003; Cristiano y col., 2008; Cristiano y col., 2009; Abad y col., 2010; Otero y col., 2010; Lucas y col., 2011). En conjunto, probablemente la EM se desarrolle en la población genéticamente susceptible como resultado de la exposición a determinados agentes del entorno.

1.1. Los oligodendrocitos como diana de las enfermedades desmielinizantes incluyendo la EM

Los oligodendrocitos (Iglesias-Rozas y Garrosa, 2012) son las células que forman la vaina de mielina que envuelve los axones neuronales en el SNC (Raine, 1991), al igual que lo hacen las células de Schwann en el sistema nervioso periférico (McTigue y Tripathi, 2008).

La vaina de mielina es una extensión de la membrana glial, que envuelve el axón en diversas capas concéntricas, con periodicidad constante, presentando un grosor final de alrededor de 1 μm , y con interrupciones periódicas denominadas nódulos de Ranvier. Cada oligodendrocito puede emitir extensiones celulares que recubren hasta 50 axones, y tienen la capacidad de renovar las vainas de mielina 3 veces en 24 horas (McTigue y Tripathi, 2008).

La mielina está compuesta por alrededor de un 40% de agua, y del peso seco, destaca una alta proporción de lípidos (70-85%), y, consecuentemente, una pequeña proporción de proteínas (15-30%). Estas proteínas son necesarias para la estructura del complejo, y entre ellas destaca la proteína de mielina básica (MBP) y la proteína proteolípida (PLP). Su principal función fisiológica es acelerar la conducción del potencial de acción a través del axón de un modo saltatorio (de nodo en nodo), de forma que éste se transmite mucho más rápido que el modo lineal que se da en axones desmielinizados (Hartline y Colman, 2007). Además, los oligodendrocitos también ejercen un efecto trófico sobre los axones y están implicados en el mantenimiento de su integridad estructural y funcional (Brady y col., 1999).

A parte de estos oligodendrocitos mielinizantes o interfasciculares, encontramos oligodendrocitos satélite o perineuronales, relacionados con la sustancia gris (Ludwin, 1997). Aunque sus características morfológicas son muy similares a las células mielínicas, no se ha descrito que tengan un papel en la formación de esta envoltura aislante. Su función parece estar relacionada con la regulación del fluido extracelular, si bien también parecen intervenir en procesos de remielinización (Ludwin, 1979).

1.2. Fisiopatología de la EM

La EM es considerada una enfermedad autoinmune en la cual células T antígeno-específicas del SNC inician una cascada inflamatoria que resulta en daño axonal. A pesar de que durante el desarrollo de las células T en el timo se produce una selección negativa que elimina poblaciones que reconocen autoantígenos como parte del proceso de autotolerancia, una parte consigue escapar, por lo que existen linfocitos T y B con capacidad de responder a antígenos propios en individuos sanos (Burns y col., 1983; Tsuchida y col., 1994). Sin embargo, en los individuos con vulnerabilidad genética, la exposición a uno de los posible desencadenantes ambientales produce la activación de estos linfocitos autorreactivos. Los linfocitos T CD4⁺ autorreactivos son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y alcanzar el SNC, lo que desencadena el proceso inflamatorio con el reclutamiento y/o activación del resto de componentes (Goverman, 2009), que finalmente lleva a la desmielinización y al daño axonal. En este entorno, las células oligodendrogiales resultan dañadas por dos tipos de mecanismos, unos que implican ataque directo por reconocimiento de sus componentes, y otros daños causados como evolución del proceso inflamatorio (**figura 1**) (revisado en Patel y Balabanov, 2012).

1.3. Tratamiento de la EM

Actualmente, la EM no tiene cura. Aunque en la actualidad hay disponibles una serie de tratamientos para frenar/ralentizar el avance de la enfermedad, éstos sólo resultan efectivos de forma parcial. Hay aprobados un total de 5 medicamentos para el tratamiento de la EM, dirigidos principalmente hacia la inmunomodulación y/o inmunosupresión de los eventos inflamatorios (Goldenberg, 2012). Los tratamientos de primera línea están constituidos por el *acetato de glatiramer* y las preparaciones de Interferón, a los que se añade el uso de *Fingolimod* limitado a los casos que no respondan a los tratamientos anteriores, y a formas de la enfermedad severas y/o de avance rápido. Para tratamientos de segunda línea, se emplean los medicamentos *Mitoxantrona* y *Natalizumab*.

Paralelamente, existen toda una serie de fármacos usados “fuera de etiqueta”, empleados en los pacientes que son refractarios o que no toleran los efectos adversos de los medicamentos anteriores, no disponen de los mismos, o que necesitan una terapia más intensa y lo complementan con la medicación general (revisado en Castro-Borrero y col., 2012).

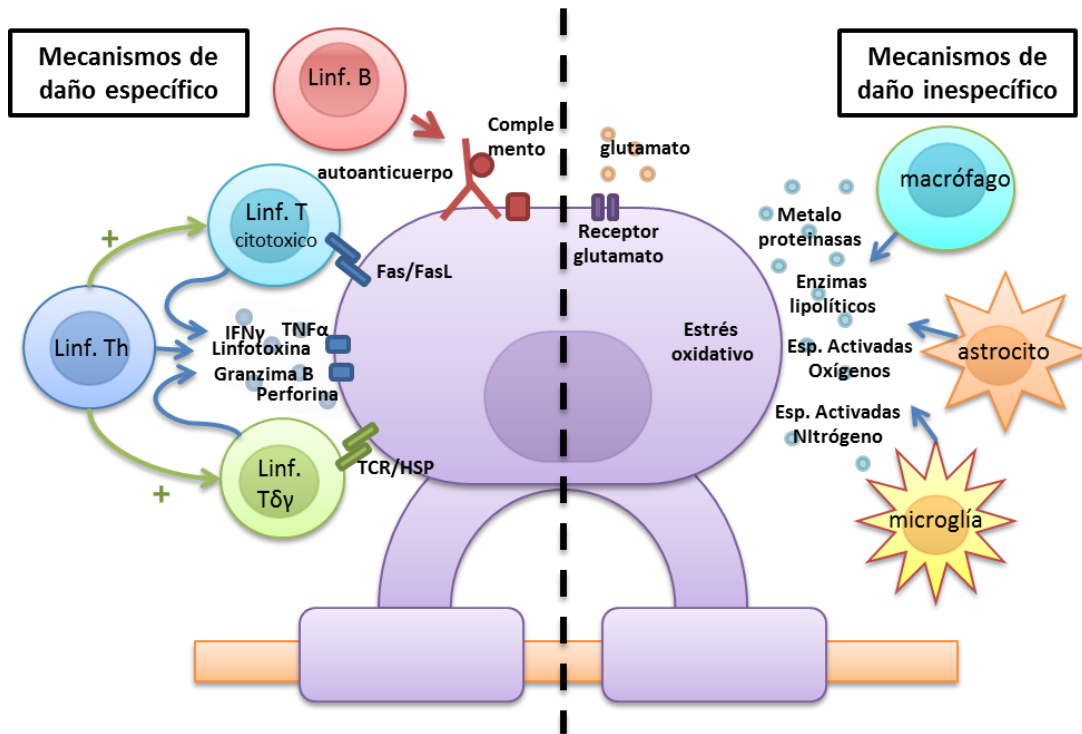


Figura 1: Mecanismos de daño específicos y generales a los oligodendrocito. En el ambiente inflamatorio de la EM, los oligodendrocitos resultan dañados tanto por la acción de los linfocitos B y T, que requieren de una interacción directa y/o reconocimiento de antígenos específicos, como por la activación de monocitos, astrocitos y microglía, cuyos compuestos generan estrés oxidativo, al cual los oligodendrocitos son especialmente sensibles (modificado a partir de Patel y Balabanov, 2012))

2. TERAPIA CELULAR

La ausencia de una cura definitiva para la EM, sumada a todos los efectos secundarios no deseados de los medicamentos actuales, y la cantidad de pacientes que no responden adecuadamente a ellos, hacen necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos más efectivos y eficaces. Una de las carencias de los tratamientos actuales es la falta de una terapia dirigida específicamente a la protección de los oligodendrocitos. Esto es en parte debido a que estas células gliales, y sus estructuras asociadas, han sido consideradas hasta hace pocos años objetivos pasivos de una respuesta inflamatoria descontrolada; sin embargo, experimentos más recientes indican que el daño oligodendroglial puede ser un evento temprano en el proceso de la enfermedad, iniciando la generación de nuevas placas de desmielinización (Rodríguez y col., 1993; Lucchinetti y col., 2000; Barnett y Prineas, 2004; Hovelmeyer y col., 2005), por ejemplo, mediante la liberación de antígenos que activen los linfocitos autoreactivos.

Dado que en la EM y en general en las enfermedades desmielinizantes se produce una pérdida de células, se ha propuesto como candidata para el desarrollo de terapias regenerativas que busquen principalmente el remplazo funcional de los componentes dañados. Esta aproximación tendría sentido tras conseguir detener el avance de la enfermedad. No obstante, mediante la introducción de las células adecuadas se podría conseguir también frenar el avance de la enfermedad, ya sea atenuando la respuesta inflamatoria (inmunomodulación) o dando soporte trófico a las células endógenas para mejorar su supervivencia (neuroprotección) (**figura 2**).

Se han propuesto varios tipos celulares como candidatos para la terapia celular (Ben-Hur, 2011), cada uno con sus ventajas e inconvenientes. Sin embargo, en la presente introducción nos limitaremos a presentar los dos tipos celulares más prometedores, pues se encuentran presentes en el cerebro humano adulto de forma natural, y por tanto, permitirían su movilización endógena además de la posible expansión *in vitro* y reimplantación en el paciente.

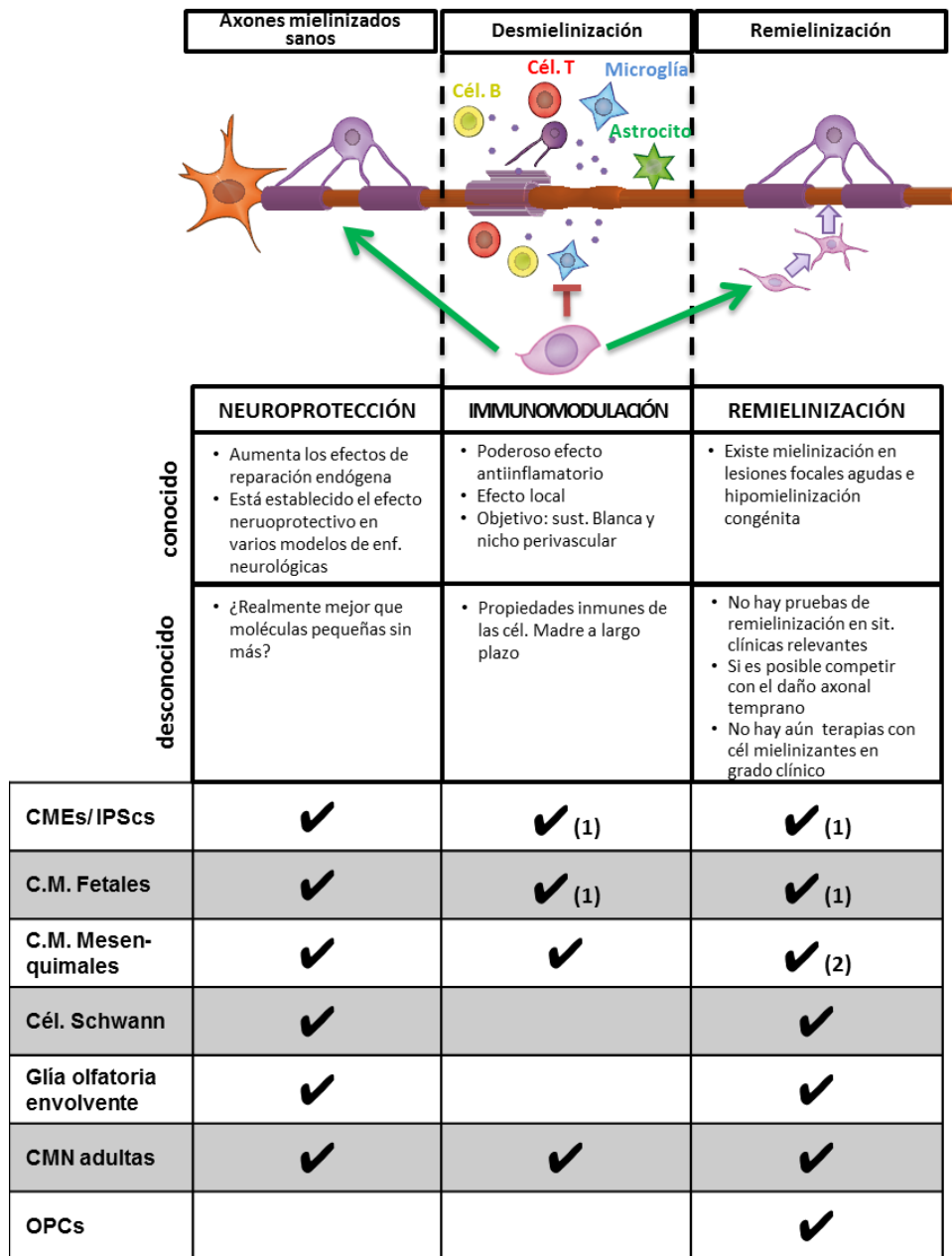


Figura 2. Mecanismos de reparación de las células usadas en terapia celular, aspectos conocidos y desconocidos de cada uno de ellos, y propiedades atribuidas a cada tipo celular. (1) Estas propiedades están basadas en el tipo celular en el que se diferencien las células. (2) La remielinización llevada a cabo por células mesenquimales es un hecho controvertido (modificado de Ben-Hur y col., 2011 y Jadasz y col., 2012a)

2.1 Células madre neurales adultas

Aunque en el pasado se ha considerado el cerebro un órgano quiescente, en el que no había producción postnatal de nuevas neuronas, hoy en día está bien establecido que existe neurogénesis adulta limitada a ciertas regiones. Las primeras evidencias de neurogénesis se obtuvieron en trabajos con canarios y lagartijas

(revisado en Garcia-Verdugo y col., 2002), y posteriormente, se confirmó en roedores, primates, y en humanos (revisado en Gil-Perotin y col., 2009).

Las dos regiones que contienen células madre neurales (CMN) en el cerebro humano adulto son la zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales y la zona subgranular (ZSG), en el giro dentado del hipocampo.

2.1.1. Giro dentado (hipocampo)

La primera zona neurogénica se encuentra localizada en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo, localizada entre la capa de células granulares y el hilus, y presenta una estructura conservada entre mamíferos y humanos (Eriksson y col., 1998).

Las CMN de la ZSG han sido identificadas como células astrocitaria, con los cuerpos celulares localizados en dicha capa y expansiones celulares extendidas a través de la capa molecular. Estos astrocitos, además de la expresión de GFAP, presentan marcadores comunes a los establecidos para las células homólogas de la zona subventricular (Knoth y col., 2010; von Bohlen und Halbach, 2011).

En cada división asimétrica generan un neuroblasto inmaduro (célula tipo D1), caracterizado por la expresión de marcadores neuronales tempranos (PSA-NCAM, doublecortin). Estas células, que pueden dividirse una vez más, migran cortas distancias dentro de la capa granular mientras van madurando y sufriendo cambios morfológicos, (células tipo D2 y D3) hasta alcanzar su posición final y diferenciarse en neuronas granulares maduras.

La utilización de estas células en el contexto de la terapia celular en EM, no parece atraer el interés de los investigadores por varios motivos: en primer lugar, algunos autores defienden que estas células son progenitores, capaces únicamente de generar neuronas, y no auténticas células madre (Seaberg y van der Kooy, 2002). Además, su difícil acceso y las dificultades que presenta su cultivo *in vitro* complican la expansión de las mismas previa a la implantación (Babu y col., 2007), requiriendo factores que mantengan su capacidad de célula madre (Bonaguidi y col., 2005; Bonaguidi y col., 2008). Finalmente, algunos trabajos también señalan que el hipocampo es una zona que con frecuencia se ve afectada durante el transcurso la enfermedad (Geurts y col., 2007; Sicotte y col., 2008; Roosendaal y col., 2010).

2.1.2. Zona subventricular

La estructura de la zona subventricular (ZSV) del cerebro humano adulto presenta una organización diferente respecto a la descrita en mamíferos de experimentación (Sanai y col., 2004; Quinones-Hinojosa y col., 2006). Se organiza en 4 capas desde el ventrículo hacia el parénquima cerebral: una capa formada por las células endimarias, otra capa hipocelular (ausente en roedores), y una tercera capa que contiene los somas astrocitarios, algunas de los cuales han sido identificados como CMN. Finalmente, la última capa contiene cuerpos celulares oligodendrocitos y algunos axones mielinizados, dando paso al resto de sustancia gris (**figura 4**).

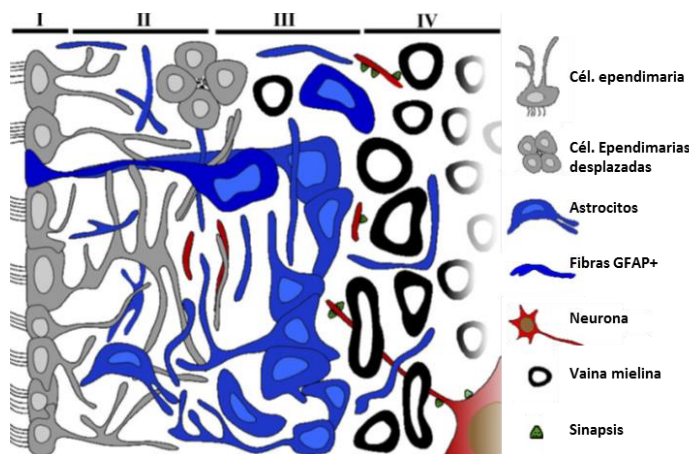


Figura 2: modelo de la composición citoarquitectónica de la zona subventricular humana adulta en corte sagital (Quiñones-Hinojosa y col, 2006).

Aunque la naturaleza de las CMN de la ZSV es una cuestión ampliamente debatida, la opinión más extendida es que las únicas células con capacidad neurogénica en condiciones normales son un tipo celular de naturaleza astrocítica (similares a las células tipo B de ratón). Además de la proteína GFAP y marcadores de proliferación (KI67 y PCNA), otros marcadores empleados para su identificación son las proteínas Nestina (Ayuso-Sacido y col., 2008), CD133 (Hassan y col., 2008), GFAP isoforma delta (van den Berge y col., 2010) o SOX2 (Baer y col., 2007). Estas células se dividirían lentamente para dar lugar a células de amplificación (células tipo C), que se dividirían más rápidamente hasta generar neuroblastos tempranos (células tipo A).

En mamíferos de experimentación se observó que estos neuroblastos migraban a través del denominado camino migratorio rostral hasta el bulbo olfatorio, donde se integran como nuevas neuronas (Lois y Alvarez-Buylla, 1994; Doetsch y Alvarez-Buylla, 1996). Sin embargo, en el caso del cerebro humano se cuestiona la existencia de una estructura análoga, puesto que aunque las cadenas migratorias son fácilmente observables en neonatos hasta los 18 meses, en el adulto apenas se observan unas

pocas células migratorias dispersas (Guerrero-Cazares y col., 2011; Sanai y col., 2011; Wang y col., 2011) Por último, además de neuronas, se ha comprobado que en ratón las CMN de la ZSV también pueden generar células de tipo oligodendroglial que son capaces de migrar por el cuerpo caloso y estriado, por lo que es posible que la mayoría de la neurogénesis adulta que se mantiene en el humano adulto tenga esa funcionalidad (Menn y col., 2006).

En modelos animales de EM se ha observado que como consecuencia de la enfermedad se produce una rápida respuesta de la ZSV: aumenta la proliferación, y además, aumenta la diferenciación hacia oligodendrocito a costa de una reducción del número de neuroblastos generados (Picard-Riera y col., 2002; Menn y col., 2006; Tepavcevic y col., 2011). En otras patologías, como la isquemia, se han observado efectos similares de reclutamiento y aumento de la tasa de división de CMN de la SZV (Marti-Fabregas y col., 2010). Además, en muestras postmortem también se ha podido comprobar que hay un aumento del número de progenitores y una mayor expresión de marcadores de linaje oligodendroglial (Nait-Oumesmar y col., 2007). Sin embargo, en la fase crónica de la enfermedad su funcionalidad parecen parece más limitada, lo que en parte puede ser debido a la acción microglial (Rasmussen y col., 2011).

Además de estimular la capacidad intrínseca de las células madre endógenas, también se pueden aislar y crecer *in vitro*, pudiendo utilizarse luego en forma de autotransplantes o alotransplantes de muestras postmortem (Leonard y col., 2009). Está bien establecido en la bibliografía que las CMN adultas pueden mantenerse y expandirse en cultivo en medio definido suplementado con bFGF y EGF, ya sea en forma de grupos de células flotantes (denominados neurosféricas) (Reynolds y Weiss, 1992), o de cultivos adherentes (Ayuso-Sacido y col., 2008). Se ha comprobado que los precursores de la ZSV humana adulta son capaces de remielinizar axones dañados en diferentes modelos de desmielinización y traumatismos (Yandava y col., 1999; Akiyama y col., 2001; Karimi-Abdolrezaee y col., 2006).

Sin embargo, otros experimentos con modelos animales han determinado que los efectos terapéuticos de las CMN no puede explicarse únicamente por el reemplazo celular, ya que la recuperación funcional es mucho más grande de lo que cabría esperar por el número de células que consiguen integrarse en el parénquima (Martino y Pluchino, 2006). Estos resultados demuestran que las células madre neurales también tienen efectos neuroprotectores, dando soporte trófico a las células, reduciendo la formación de escara glial (Teng y col., 2002) y contribuyendo a la

creación de un ambiente más permisivo para la regeneración (Lu y col., 2003; Mahmood y col., 2004; Ferrer-Alcon y col., 2007). Asimismo, también se ha comprobado que son capaces de atenuar la respuesta inmune (Einstein y col., 2003; Menn y col., 2006), reduciendo la proliferación y acción de los linfocitos (Fainstein y col., 2008) y/o induciendo la muerte celular de los mismos (Pluchino y col., 2005).

2.2. Células progenitoras de oligodendrocitos

De entre todos los candidatos propuestos, los progenitores de oligodendrocitos presentan unas características especialmente adecuadas para el desarrollo de una terapia de reemplazo celular. En primer lugar, su diferenciación está dirigida hacia el tipo celular afectado primariamente por las enfermedades desmielinizantes, los oligodendrocitos. Además, presentan la ventaja de encontrarse de forma natural en el tejido de origen, son reclutados por las placas de desmielinización (Solding y col., 1998) y parecen ser los responsables de los eventos de remielinización detectados ya desde estudios tempranos (Raine y col., 1981; Prineas y col., 1989).

En roedores, y en menor medida en humanos, la gliogénesis cortical ha sido bien estudiada (Cameron y Rakic, 1991; Jakovcevski y Zecevic, 2005b). Las principales zonas de origen de las células progenitoras de oligodendrocitos se localizan en las eminencias ganglionares medias y la zona enteropeduncular anterior, aunque la zona ventricular parece también una fuente secundaria importante (Jakovcevski y Zecevic, 2005b). Los cambios morfológicos e inmunofenotípicos han sido bien establecidos mediante su aislamiento y cultivo *in vitro* (figura 3).

En cerebro adulto, la terminología utilizada para referirse a la población de progenitores gliales ha cambiado a medida que aumentaba el conocimiento sobre los mismos. Uno de los primeros términos para referirse a estas células fue *oligodendrocyte-type-2-astrocyte precursor cells* (O-2As), descubiertas en primer lugar en nervio óptico de rata perinatal, y denominadas así porque en cultivo sin suero animal se diferenciaban a oligodendrocitos, mientras que en medio con suero se diferenciaban a astrocitos tipo 2 (Raff y col., 1983b; Raff y col., 1983a). Posteriormente también se aislaron progenitores similares a partir de nervio óptico adulto (Ffrench-Constant y Raff, 1986a; Ffrench-Constant y Raff, 1986b), aunque estas células se dividían, migraban y se diferenciaban más lentamente, características más apropiadas para el tejido adulto (Wolswijk y Noble, 1989; Wren y col., 1992).

La expresión O-2As fue gradualmente reemplazada en los sucesivos trabajos por células progenitoras de oligodendrocitos (CPOs, en inglés *OPCs*, *oligodendrocyte progenitor cells*) (término acuñado por Barres y col., 1992)) dado que estudios posteriores demostraron que los astrocitos tipo 2 no se generaban *in vivo* (Skoff, 1990; Fulton y col., 1992). Finalmente, algunos autores han escogido como denominación células progenitoras de la sustancia blanca (WMPC, del inglés *White matter progenitor cells*), puesto que se ha visto que en las condiciones de cultivo adecuadas son capaces de generar también neuronas (Nunes y col., 2003).

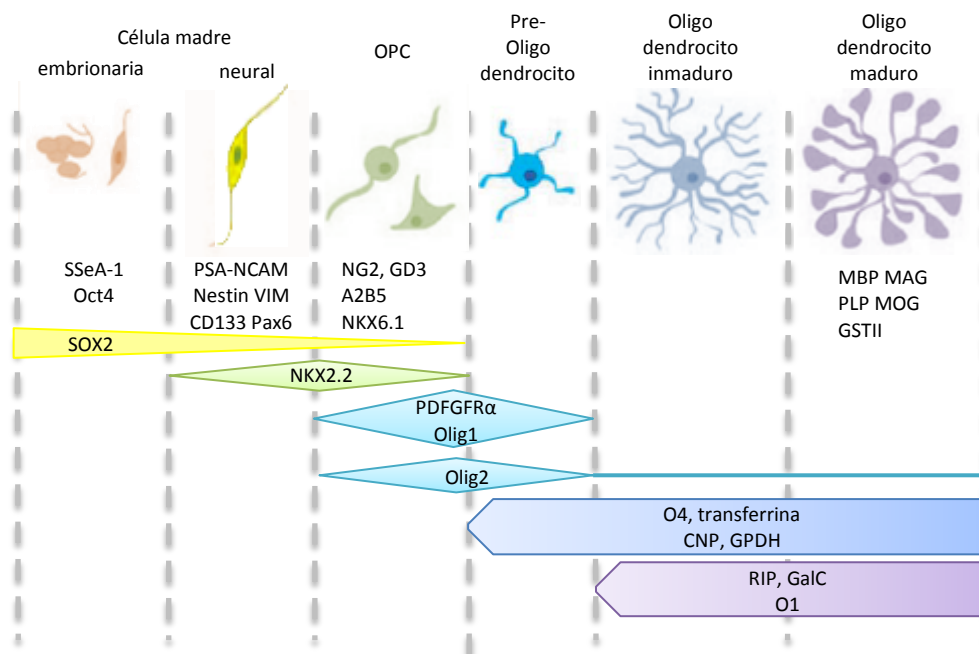


Figura 3: Marcadores moleculares establecidos para los distintos estadios de diferenciación hasta oligodendrocito maduro (modificado de Espinosa-Jeffrey y col., 2009)

En los sucesivos trabajos, entre los que destacan especialmente los desarrollados por los grupos de los doctores Goldman y Scolding (**figura 4**), se han descrito varias subpoblaciones, en su mayor parte a través de protocolos de aislamiento selectivo con un marcador específico. Estos trabajos dan una idea de la heterogeneidad que se esconde tras la denominación de progenitor de oligodendrocito, y por tanto, que la búsqueda de nuevas poblaciones con propiedades potencialmente diferentes está más que justificada.

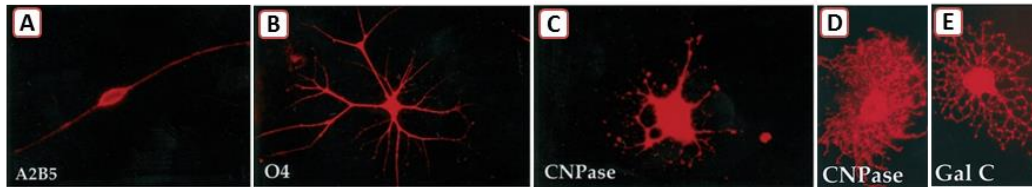


Figura 4. Cambios morfológicos durante la diferenciación a oligodendrocito maduro de los progenitores aislados de sustancia blanca humana adulta. Se observa que en estadios iniciales, las células A2B5+ (A) son generalmente bipolares, que generan células O4+ más ramificadas y sin ya sin capacidad proliferante (B). Conforme avanza la diferenciación las células en cultivo comienzan a desarrollar una red de extensiones de membrana a su alrededor (C-E), hasta que finalmente se empiezan a detectar GalC (E) y otras proteínas de mielina (fotografías de Roy y col., 1999).

2.2.1. Primeras descripciones: preoligodendrocitos O4⁺ y población A2B5⁺

En 1992, Armstrong y col., 1992 describieron la existencia de preoligodendrocitos no proliferativos a partir de sustancia blanca humana adulta obtenidas de la resección quirúrgica de lóbulo temporal. Estas células, caracterizadas por la expresión del marcador O4, fueron halladas tanto en cultivo *in vitro* como in situ a través de la técnica de *tissue printing*.

Sin embargo, el descubrimiento de las CPO proliferantes dentro del conjunto de células aisladas fue presentado en un trabajo posterior (Scolding y col., 1995). Al igual que las células descritas anteriormente en rata, se caracterizaban por la inmunoreactividad contra el anticuerpo A2B5 y la generación de astrocitos y oligodendrocitos en cultivo. Su presencia también se demostró in situ de forma indirecta usando *tissue printing* con dicho anticuerpo (Scolding y col., 1999). En cuanto a la significación del marcador A2B5, hasta 2010 no se determinó que el anticuerpo monoclonal reconoce los residuos de ácido α 2,8-trisiálico de glicoproteínas de la superficie celular (Inoko y col., 2010).

En el año 2002 aparecieron los primeros trabajos en los que conseguían aislar las células A2B5⁺ mediante la tecnología MACS y FACS (Windrem y col., 2002). Estas células, pequeñas y de morfología bipolar alargada, fueron marcadas e introducidas en un modelo de desmielinización por isolecitina. Se observó que dichas células eran capaces de sobrevivir, migrar hacia los focos de desmielinización y generar oligodendrocitos maduros (MBP⁺), aunque también generaban astrocitos.

Este hecho, junto a la evidencia de que un número reducido de neuronas se generaban cuando las células eran cultivadas a bajas densidades, apuntaba hacia

una posible multipotencialidad celular. Esta hipótesis fue confirmada con la generación de neurosféricas tras el aislamiento selectivo, con una autorrenovación limitada y que podían generar células de los tres linajes neurales, incluyendo neuronas tanto *in vitro* como tras la introducción en cerebro embrionario de rata (Nunes y col., 2003).

Los CPOs de humano adulto (A2B5⁺ PSA-NCAM⁺) fueron también comparados con los progenitores aislados de cerebro fetal (Windrem y col., 2004), detectándose algunas diferencias relevantes al inyectarlos en ratones con desmielinización congénita (ratones *shivered*). Las células fetales mostraron una mayor migración, pero, por el contrario, los progenitores adultos eran capaces de remielinizar de forma más rápida y eficaz, además de no presentar diferenciación astrogial, sugiriendo que éstos últimos representarían una población más dirigida hacia oligodendrocito.

2.2.2. Población PDGFRα⁺

En el segundo trabajo que surgió tras la primera descripción de los CPOs (Scoling y col., 1998), observaron que la población A2B5⁺ era prácticamente coincidente con la población PDGFRα⁺ (*Platelet derived growth factor receptor α*) *in vitro*, lo que permitía estudiar su presencia *in situ* directamente gracias a este segundo marcador. El receptor PDGFRα⁺ ya había sido relacionado con células progenitoras de oligodendrocitos en trabajos anteriores (Pringle y col., 1992). Observaron que los CPOs estaban presentes en el tejido normal y mostraron las primeras evidencias de que eran movilizados hacia las placas de desmielinización en pacientes con EM, aunque su diferenciación e integración parecía limitada (Maeda y col., 2001). Hasta la fecha, únicamente se ha descrito el aislamiento de células PDGFRα⁺ de tejido fetal (Sim y col., 2011).

2.2.3. Población CNP⁺

Aunque inicialmente descritas como A2B5⁺, la primera estrategia de purificación de una subpoblación de CPOs consistió en la transfección liposomal de las células con una construcción p/hCNP2:hGFP (Roy y col., 1999). Mediante FACS, se aislaron las células en las que se encontraba activa la secuencia reguladora de la proteína de mielina CNPasa (2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase) asociada a un estado temprano de compromiso a linaje oligodendrogial, y que se correspondía con menos del 1% del total de células aisladas por disociación. Esta población progresaba en cultivo hasta dar en su mayoría oligodendrocitos de fenotipo más maduro, aunque también generaban una pequeña proporción de astrocitos y neuronas inmaduras. De

entre toda la población GFP⁺, destacaba la presencia de células A2B5⁺ que se correspondían con prácticamente el total de células mitóticamente activas. Estudios posteriores demostraron que alrededor del 84% de las células CNP2⁺ eran A2B5⁺, y, aunque asumieron su equivalencia, esta metodología de aislamiento se ha dejado de lado porque la tasa de transfección hace que el aislamiento de progenitores sea más limitado (Nunes y col., 2003). Además, el marcador CNP presenta otro inconveniente: de momento no existen anticuerpos comerciales que reconozcan isoformas de forma específica, y dado que la isoforma madura se expresa en oligodendrocitos maduros, no es viable su seguimiento en el tejido original.

2.2.4. Población NG2⁺ y OLIG2⁺

Otro de los marcadores que ha sido relacionado con células precursoras de oligodendrocitos pero no ha sido empleado para un aislamiento selectivo ha sido el condroitin sulfato proteoglicano, conocido como NG2. Desde su descripción en el nervio óptico se ha relacionado con los O-2As, tanto perinatal como en el animal adulto (Stallcup y Beasley, 1987). Del mismo modo, el factor de transcripción OLIG2 aparece en la bibliografía íntimamente ligado a la expresión de NG2, siendo necesario para la producción de oligodendrocitos (Jakovcevski y Zecevic, 2005a).

En parénquima cerebral adulto se corresponde con alrededor del 5% del total de células (Chang y col., 2000), por lo que se ha ganado el sobrenombre de “el quinto elemento” (Butt y col., 2005). Sin embargo, bajo esta denominación se encuentran células muy diferentes con funciones muy dispares según su localización. Así, mientras que en la corteza (sustancia gris), estas células presentan actividad eléctrica y conexiones sinápticas con neuronas (Haberlandt y col., 2011), en la sustancia blanca la glía NG2⁺ no presenta esta actividad eléctrica y podría estar implicada en procesos de remielinización. En cultivo, son capaces de actuar como células multipotentes y generar neurosféricas cuando son expuestas a suero fetal o proteínas morfogenéticas de hueso (Richardson y col., 2011). Sin embargo, esta capacidad *in situ* está más discutida. En cualquier caso, en humanos sí se ha comprobado que se corresponden con la gran mayoría de células en fases activas de ciclo celular en el parénquima cerebral adulto (Rhee y col., 2009; Geha y col., 2010), además, también aparecen en las placas de desmielinización de pacientes con EM (Chang y col., 2000).

2.2.5. Cultivo de células progenitoras

A pesar de todas las ventajas mencionadas anteriormente, las evidencias apuntan a que la remielinización es bastante más limitada de lo que cabría esperar. Por un lado, se sabe que, si bien las células son reclutadas durante las fases agudas de la remielinización, el ambiente inflamatorio y la gliosis reactiva inhiben su entrada a la placa esclerótica y posterior diferenciación, resultando también afectadas y muriendo (revisado en Keirstead y Blakemore, 1999). Además, su capacidad migratoria y de remielinización se ve disminuida con la edad (Foote y Blakemore, 2005).

Por ello, la estrategia de aislar y expandir los progenitores de oligodendrocito, de manera similar a las células madre neurales, también han sido abordadas en diversas ocasiones. Dado que parece que sólo son capaces de sobrevivir en el tejido afectado tras la muerte de los progenitores endógenos, resultarían especialmente interesantes para su trasplante tras el agotamiento de las células presentes (Foote y Blakemore, 2005). En cualquier caso, los cultivos celulares suponen un modelo para conocer más acerca de la biología de las células, su respuesta a factores de crecimiento y el proceso de diferenciación para poder modular su actividad *in situ*. El protocolo de aislamiento usado habitualmente no es muy diferente del utilizado para el cultivo de CMN, aunque se ha implementado en dos apartados importantes:

Métodos de purificación: En la bibliografía se han descrito diferentes métodos de purificación. Los más destacados han sido aquellos que utilizan anticuerpos para el aislamiento ya sea mediante FACS o MACS, como se ha descrito anteriormente para A2B5 o CNP (Roy y col., 2000; Windrem y col., 2002). Sin embargo, también existen protocolos que utilizan solventes que generan gradientes para conseguir una fracción celular determinada de acuerdo a su densidad (Colello y Sato-Bigbee, 2001). Por último, en animales de experimentación también se ha descrito la separación de fracciones oligodendrogiales usando la adhesión diferencial de las células (Chen y col., 2007b).

Medios y factores de crecimiento: Aunque las células son capaces de sobrevivir en medio general suplementado con EGF y FGF gracias a la producción para/autocrina de factores propios, se ha comprobado que los medios suplementados con EGF y PDGF favorecen específicamente el crecimiento de los progenitores gliales, manteniendo su fenotipo indiferenciado. También se ha comprobado que el crecimiento se ve favorecido con la adición de otros factores, como la triyodotironina (T3), neurotrofina 3 (NT3), o el selenito (Barres y col., 1994; Park y col.,

2001; Billon y col., 2002). Como resultado, se obtienen poblaciones cuyo crecimiento puede ser en forma adherente (monocapa), o bien como esferas flotantes, similares a las neuroesferas, pero que contienen progenitores de oligodendrocitos (Chen y col., 2007b).

3. SOX2

SOX2 (*SRY box related 2*) pertenece a una familia de genes que codifica para una superfamilia de factores de transcripción. Su principal característica es que presentan una secuencia homóloga de unión al surco menor del ADN denominada *high mobility group box* que reconoce la secuencia $^{A}/_{T}^{A}/_{T}CAA^{A}/_{T}G$. Todos los miembros de la familia comparten al menos un 50% de homología con la secuencia HMB del gen SRY (SOX1), implicado en la determinación del sexo masculino. El resto de secuencia es altamente variable y muestra diversos dominios de interacción con otras proteínas reguladoras, que le permiten ejercer una amplia diversidad de funciones. En el caso humano, se han descrito 20 genes clasificados en subgrupos de acuerdo a su funcionalidad y estructura (Sinclair y col., 1990) (**tabla 2**). En general, los genes SOX participan en la regulación de aspectos esenciales del desarrollo (Chew y Gallo, 2009)

Tabla 2. Subgrupos y componentes de la familia SOX en humanos

SUBGRUPO	COMPONENTES		
SoxA	SRY		
SoxB1	SOX1	SOX2	SOX3
SoxB2	SOX14	SOX21	
SoxC	SOX 4	SOX11	SOX 12
SoxD	SOX5	SOX6	SOX13
SoxE	SOX8	SOX9	SOX10
SoxF	SOX7	SOX17	SOX18
SoxG	SOX15		
SoxH	SOX30		

3.1. Papel de SOX2 en las células madre embrionarias:

SOX2 es uno de los factores de transcripción altamente expresados en las células madre embrionarias, tanto humanas (Adachi y col., 2010) como de ratón (Masui y col., 2007), junto a otros factores como Oct3/4 o Nanog, a los que se les atribuye un papel clave en el fenotipo de células madre pluripotente.

Aunque la totalidad de los mecanismos moleculares por los cuales SOX2 mantiene el estado indiferenciado y previene la diferenciación son aún desconocidos, sí se conocen algunos de los componentes implicados en dicha regulación. La proteína SOX2, al igual que el resto de miembros de la familia SOXB1, tiene un papel principalmente activador, promoviendo la transcripción de los genes diana mediante la unión a los elementos reguladores.

Otra consideración acerca de su actividad es que SOX2 actúa como cofactor, interaccionando directamente con otros factores de transcripción. De acuerdo a lo descrito para las células embrionarias de ratón, muchos de los sitios de unión de SOX2 son SOX2/Oct3/4, otro gen característico del estado indiferenciado. En este sentido, se ha comprobado que, si bien las células embrionarias a las que se silencia SOX2 se produce una rápida diferenciación hacia trofoectodermo (Avilion y col., 2003), pueden ser rescatadas si se induce un aumento de la expresión de Oct3/4 (Masui y col., 2007). Este fenómeno parece indicar que una de las funciones principales de SOX2 sería mantener niveles altos de Oct3/4, tanto mediante la expresión de elementos activadores (Nr5a2) como mediante la inhibición de la expresión de represores (Nr2f2) (Masui y col., 2007). Entre los genes que poseen secuencias de unión al complejo SOX2-OCT3/4 se encuentran FGF4 o Nanog, también implicados en el mantenimiento de la pluripotencia. Del mismo modo, SOX2 y Oct 3/4 también se unen al promotor de miR302, un grupo de microARNs expresados en células madre y células pluripotentes, que llevan a la represión de la expresión de ciclina D1 y promueven el avance hacia la fase S del ciclo celular (Card y col., 2008).

Sin embargo, además de controlar la expresión de Oct 3/4, otros estudios señalan que SOX2 debe tener otras funciones. Cuando se intenta generar células pluripotentes inducidas (IPSc, del inglés *induced pluripotent stem cells*) sin introducir construcciones que porten SOX2 no se alcanza un estado pluripotente, lo cual indica que la expresión de Oct 3/4 y los genes con la secuencia regulatoria Sox2-Oct no son suficientes por sí solos para inducirlo, y SOX2 tiene otros papeles en el mantenimiento del estado indiferenciado.

3.2. Papel de SOX2 en el desarrollo

En el desarrollo temprano, SOX2, junto a los otros miembros de la familia SOXB1, son los responsables de la competencia neuroectodermal (Kishi y col., 2000).

Hasta el estado de mórula, SOX2 se encuentra expresado en todas las células, pero ya durante la gastrulación temprana su expresión queda restringida al

ectodermo anterodistal (Avilion y col., 2003; Ellis y col., 2004), que se corresponde con el presuntivo neuroectodermo. Conforme el tubo neural se cierra, SOX2 puede ser detectado a lo largo de todo el eje anteroposterior del sistema nervioso en desarrollo, marcando las zonas proliferativas. La expresión de SOX1 y SOX3 resultan altamente coincidentes con la de SOX2 (Zappone y col., 2000; Pevny y Placzek, 2005), exhibiendo cierta redundancia y compensando la pérdida de alguno de los tres genes. Además de en el cerebro y tubo neural, la expresión también es detectable en las placodas sensitivas, los arcos branquiales, el endodermo intestinal y en las células germinales de ambos sexos (Avilion y col., 2003).

Conforme la proliferación avanza, el epitelio pseduoestratificado del tubo neural inicial va dando paso a un epitelio pluriestratificado. En ese momento, la expresión de SOX2 va quedando relegada a la zona proliferativa de la zona ventricular interna, aunque también se puede detectar en menor cantidad en la ZSV y la zona intermedia (Wang y col., 2010a).

3.3 Papel de SOX2 en las células madre neurales adultas:

La expresión de SOX2 se mantiene en las CMN adultas, tanto en rata y ratón (Ellis y col., 2004; Komitova y Eriksson, 2004), como en la ZSV (Baer y col., 2007) y la ZSG (Knoth y col., 2010) humana, concretamente en células proliferantes que no expresan marcadores de neurona tempranos (Bylund y col., 2003). No obstante, en roedores se ha comprobado que también se expresa en astrogliá, y algunas poblaciones neuronales del núcleo caudado y putamen, el cuerpo calloso, células piramidales del córtex cerebral, algunas neuronas estriatales y muchas de las neuronas talámicas, así como en el epéndimo ventricular (Komitova y Eriksson, 2004).

Los ratones sin ninguna copia activa del gen no son viables y los ratones mutantes (con una única copia activa y mutada), además de una baja viabilidad, exhiben cambios fenotípicos importantes (Ferri y col., 2004). Estos animales recuerdan al fenotipo que se observa en pacientes humanos con mutaciones en el gen SOX2, que sufren de anolftalmia y crisis epilépticas (Sisodiya y col., 2006; Schneider y col., 2009). Además de la pérdida de neuronas, entre las que destacan aquellas poblaciones en las que se detectaba expresión de SOX2, en estos animales se observaba una reducción muy importante del número de células madre en el nicho neurogénico, aunque parte de ellas sobrevivían gracias a la acción redundante de los genes SOXB1.

Al igual que ocurre en el estado embrionario, la función principal de SOX2 parece ser el mantenimiento del estado indiferenciado. La expresión forzada de SOX2 mantiene el estado de célula madre pero no afecta a la proliferación (Bani-Yaghoub y col., 2006). Por el contrario su inhibición mediante construcciones induce la diferenciación prematura de los progenitores hacia neuronas, al producirse un desequilibrio entre la expresión de Sox2 y genes proneurales (Graham y col., 2003). No obstante, los estudios en células embrionarias y tumores sugieren que, aunque más limitado, SOX2 también tiene un papel más limitado en la regulación del ciclo celular, y por tanto, de la proliferación. Así, en cáncer de mama y en las células madre embrionarias parece regular la expresión de ciclina D1, pero no de otras proteínas del ciclo como la ciclina D3 o E (Chen y col., 2008).

JUSTIFICACIÓN

HIPÓTESIS

OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Como se ha expuesto en la introducción, las células progenitoras de oligodendrocitos (CPOs) son el tipo celular más prometedor para el desarrollo de nuevas terapias de reemplazo celular en enfermedades desmielinizantes. No obstante, los trabajos publicados en los últimos años apuntan a que los CPOs constituyen una población heterogénea. Por otro lado, la disponibilidad de muestras quirúrgicas de tejido cerebral humano adulto normal es muy baja y el éxito en el aislamiento y cultivo de CPOs utilizando los protocolos actuales es reducido, lo que limita aún más la posibilidad de estudiar dichas células.

Por ello, la optimización de la metodología de obtención de las CPOs resulta una cuestión fundamental de cara a un uso terapéutico futuro.

HIPÓTESIS

La mejora de las técnicas de aislamiento de progenitores gliales de la sustancia blanca humana adulta permitiría estudiar un mayor número de muestras, de forma que favorecería la identificación de nuevas subpoblaciones celulares.

OBJETIVOS

1. Obtención, caracterización y expansión de células progenitoras a partir de la sustancia blanca de muestras de lóbulo temporal humano adulto.
2. Optimización del protocolo de aislamiento de células progenitoras y búsqueda de nuevas subpoblaciones de progenitores gliales.
3. Estudio *in vitro* de la capacidad de las células progenitoras aisladas para generar células de linaje oligodendroglial.
4. Búsqueda en el tejido de origen de las nuevas subpoblaciones encontradas *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1. Muestras de sustancia blanca de tejido cerebral humano adulto

El presente estudio fue aprobado por la Comisión de Ética del Hospital La Fe de Valencia. Un total de 37 muestras de sustancia blanca fueron obtenidas del lóbulo temporal extirpado por el servicio de neurocirugía como parte del abordaje para la resección de las estructuras mesiales afectadas por epilepsia farmacorresistente, tras la firma del consentimiento informado del paciente.

La media de edad de pacientes era de 38.53 ± 10.98 años, con un rango de edad comprendido entre 17 y 55 años.

1.2. Muestras de tumores gliales

Como parte de otros proyectos del laboratorio, también se deponían en el laboratorio de una colección de muestras de tumores gliales, tanto de muestras de ARN aisladas de tejido fresco mediante TRI Reagent™ (Sigma) como muestras de tejido fijadas con paraforladehído (PFA) al 4%. Estas muestras también fueron obtenidas, tras el consentimiento informado por parte del paciente, por el servicio de oncología del Hospital la Fe.

2. ESTUDIO DE LAS MUESTRAS

Además del estudio histopatológico rutinario realizado por el servicio de patología del Hospital la Fe, que confirmó el diagnóstico de epilepsia debida a esclerosis mesial, se realizaron estudios complementarios utilizando técnicas de inmunohistoquímica y resonancia magnética, para asegurar la validez de los resultados posteriores.

2.1. Estudio por resonancia magnética

Las imágenes de Resonancia Magnética con tensor de difusión fueron adquiridas por el equipo de neurocirugía del Hospital La Fe (Valencia). Las imágenes fueron obtenidas con una secuencia “echo-planar” (EPI), empleando los siguientes parámetros (TR= 10.100 ms, TE= 102 ms, FoV (field of view) = 250 mm, resolución en plano de 2x2 mm, matriz = 128 x 128, averaging = 2, vóxel = 1.95 x 1.95 x 2 mm). Con este método se obtuvieron 70 imágenes correspondientes a cortes contiguos de 2 mm en plano axial (sin gap). Las imágenes fueron adquiridas en 30 direcciones no colineales ($b=1000 \text{ s/mm}^2$). Fue requerida también una imagen de referencia con valor “b” de 0 s/mm^2 . Posteriormente fueron analizadas mediante el software DTV.II SR toolbox, Image Computing and Analysis Laboratory (UTRAD/ICAL) Department of

Radiology, The University of Tokyo Hospital, extension of Volume 1, package (<http://www.volume-one.org/>). Los parámetros empleados para este análisis fueron (grado de sensibilidad para generar trector de DTI: FA=0.05, pasos= 160; ADC (x1K): cualquiera; So <80; Ángulo: cualquiera; Tamaño y orientación dependiente de la región de interés (ROI)).

2.2. Estudio inmunohistoquímico

Cortes de 12 µm de muestras de lóbulo temporal, realizados con criostato, fueron sometidos a tinciones contra el marcador Neuronal NeuN con el fin de analizar la presencia de heterotopia neuronal y desorganización cortical, de acuerdo a los procedimientos explicados más adelante en el apartado de inmunohistoquímica. Del mismo modo se procedió también al análisis de la activación microglial mediante inmunotinción para el marcador de microglía IBA1.

2.3. Recuento automatizado de células Ki67⁺

Parte de las muestras de lóbulo temporal fueron incluidas en parafina y seccionadas mediante un micrótopo de parafina. La tinción inmunohistoquímica contra la proteína Ki67 fue realizada mediante el aparato de laboratorio automatizado Benchmark ULTRA, empleando como anticuerpo el clon 30-9 (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). La interpretación posterior se llevó a cabo mediante el programa de gestión y análisis de imágenes iScan Coreo y Virtuoso algorithm (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Cortes de glioblastoma/glioma fueron empleados como control positivo.

3. TÉCNICAS EX VIVO

3.1. Aislamiento de células proliferantes

Las 14 primeras muestras fueron procesadas siguiendo el protocolo descrito en Ayuso-Sacido y col (2008), siempre antes de 12 horas tras la extracción.

En primer lugar, se llevaba a cabo una separación microscópica de la sustancia blanca de las muestras de lóbulo temporal, y tras el troceado y lavados en HBSS (*Hanks Balanced Salt Solution*) sin Ca²⁺ ni Mg²⁺, se procedía a la digestión en Solución 1 (papaína (140 U/ml) y DNAsa (140u) en solución PIPES) 90 minutos a 37°C. Posteriormente se pasaban a solución 2 (50% de Solución 1 + 80U de DNAsa en DMEM-F12, y se mantenía 30 min a 37°C. El tejido era posteriormente triturado

con la ayuda de pipetas de vidrio de diámetro decreciente, y filtradas con un filtro de 70 nm de poro. Se procedía a un par de lavados con DMEM-F12 y se sembraban en el medio de crecimiento.

3.1.1. Optimización del protocolo de aislamiento de células proliferantes

Tras todo el protocolo descrito anteriormente, en el procesado del resto de las muestras se incluyó un paso final para eliminar los restos celulares y de mielina. El disgregado celular fue resuspendido en una solución de sacarosa 0'9M-0'5 HBSS -/- y centrifugado a 750g durante 10 min, tal y como aparece descrito en (Johansson y col., 1999). El sobrenadante era aspirado y el pellet celular era sembrado en medio de crecimiento.

3.2. Cultivos celulares humanos

Las células obtenidas fueron resuspendidas en un medio definido (**tabla 4**), suplementado con bFGF (*basic fibroblast growth factor*) (10ng/ml, Sigma), Heparina (2 µg/ml, Sigma) y EGF (*epidermal growth factor*) (10ng/ml, Sigma). Los medios eran cambiados cada 3 días.

Tabla 4: composición del medio empleado para la expansión de las células

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN	CASA COMERCIAL
DMEM/F12 con L-glutamina y 15mM HEPES	--	Gibco
Aminoácidos no esenciales	100µM	Gibco
HEPES	2mM	Sigma
D-Glucosa	30 mM	Gibco
Albúmina de suero bobino (F5)	0,00%	Gibco
Piruvato sódico	1mM	Gibco
Glutamina	2mM	Gibco
Penicilina/estreptomicina/Fungizona	1X	Gibco
Suplemento N2	1X	Gibco
Hidrocortisona	300ng/ml	Sigma
Triyodotironina	30 ng/ml	Sigma

3.2.1. Células en monocapa

Cuando las células que se expandían como monocapa alcanzaban un crecimiento cercano a la confluencia, se procedía a su subcultivo. Las células eran lavadas 2 veces con HBSS sin calcio ni magnesio, y después se incubaban en un volumen de Triple Express™ (Invitrogen) suficiente para que quedaran cubiertas durante 5 minutos a 37°C. La suspensión celular se recogía en un tubo estéril y se

centrifugaba a 1200 rpm durante 5 min. El sobrenadante se descartaba, y el sedimento celular era resuspendido en un volumen conocido y se procedía al recuento de viables con cámara Neubauer y azul tripán (Sigma).

Las células eran resembradas a una densidad de 2000 células/cm² en frascos de 25cm². Siguiendo el mismo protocolo, las células obtenidas por el protocolo original fueron subcultivadas hasta entrar en quiescencia/senescencia.

El resto de células era criocongelado. Para ello, las células eran resuspendidas en una solución de medio con 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) a una concentración de 50.000 cél/ml en crioviales (Nunc, Rochester, NY). Los crioviales fueron introducidos en congelador de -80°C en un contenedor de isopropanol, y tras 2 días fueron transferidos a tanques de nitrógeno líquido para su conservación.

Cuando era necesario, los viales eran descongelados rápidamente con el calor de fricción y resuspendidos en 5 ml de medio atemperado. Se centrifugaban a 1200 rpm durante 5 min, se eliminaba el sobrenadante, se procedía al recuento de viables y se añadía el medio necesario para poder sembrar a 2000 cél/cm².

3.2.2. Cultivo en esfera

Las células obtenidas utilizando el gradiente de sacarosa, que generaban esferas y células adheridas, eran tratadas de la siguiente forma: cuando se observaba que las esferas no aumentaban en diámetro, se recogía la fracción flotante (esferas) y se disgregaban con la ayuda de una pipeta de vidrio de pequeño diámetro pulida a la llama hasta que no se observaban agregados. Se hacía un recuento de viables con azul tripán, y se sembraban a una densidad de 3000 cél/cm². Las células adheridas generadas a partir de las esferas se subcultivaban separadamente siguiendo el procedimiento anterior.

En algunos casos las esferas mostraban tendencia a adherirse a la placa, por lo que se cambiaban a placa de ultra baja adherencia (Nunc, Rochester, NY).

3.2.2.1. Ensayo de generación de cultivos flotantes a partir de células en monocapa.

Células de 3 cultivos adherentes generados a partir de las neuroesferas fueron descongelados y sembrados a una densidad de 3000 cél/cm² en placas de ultrabaja adherencia (Nunc; Rochester, NY) en dos condiciones diferentes, en medio normal o en medio con β -mercaptoetanol a una concentración de 100 μ M, de acuerdo a lo descrito en Kukekov y col. (1997). Los medios fueron cambiados cada dos días. El

seguimiento de la viabilidad celular fue medido mediante una tinción de calceína (Sigma) y yoduro de propidio (Sigma).

3.3. Cultivos de líneas celulares comerciales

Como control positivo y negativo en algunos experimentos se utilizaron líneas celulares comerciales.

Las líneas tumorales U87 y U373 fueron cultivadas en un medio compuesto de DMEM: F12 (1:1), 10% de suero fetal bobino, 5% de suero de caballo y 1X de penicilina/estreptomicina.

Los fibroblastos de piel humana (Fundación INBIOBANK (San Sebastián, España)) fueron expandidos en un medio compuesto por DMEM bajo en glucosa (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% Suero Fetal Bovino (Gibco-Invitrogen), L-glutamina (1:100, Sigma-Aldrich) y 1% Penicilina/Estreptomicina.

El subcultivo, congelación, descongelación y sembrado para su uso en inmunocitoquímica se realizó de acuerdo a la metodología descrita para las células en monocapa.

3.4. Cultivo de hibridoma para la producción de anticuerpo A2B5

El hibridoma fue adquirido de la ATCC (*American Type Collection Culture*). El vial fue descongelado y expandido en medio compuesto por DMEM alto en glucosa suplementado con 10% de Suero fetal bobino y 1% Penicilina/Estreptomicina (Gibco-Invitrogen). Tras la primera expansión se generaron crioviales de 10^6 células resuspendidas en una solución de medio y 10% de DMSO para su posterior uso. Para la obtención del sobrenadante con anticuerpo, las células fueron sembradas en un frasco de 75 cm² hasta alcanzar la confluencia total cambiando el medio cada 3 días en un incubador a 37°C y una concentración de 10% CO₂ y 5% O₂. Se mantuvieron sin cambiar el medio durante dos semanas, con el fin de que fueran muriendo y acumulando inmunoglobulinas en el sobrenadante. Tras ese periodo, se recogió la suspensión, se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos, se alicuotaron en volúmenes de 1 ml y se congelaron hasta su utilización. Para su validación se usó Western Blot para detectar la banda de anticuerpo y las

primeras inmunocitoquímicas fueron realizadas en paralelo con el anticuerpo comercial ya purificado, observándose idénticos resultados.

3.5. Ensayos de diferenciación espontánea

Se empleó un método descrito en la bibliografía para la diferenciación espontánea de las células proliferativas aisladas de sustancia blanca de tejido cerebral humano adulto, tratando de favorecer una diferenciación oligodendroglial.

El tratamiento consiste en una primera expansión con el medio de la **tabla 6**, suplementado con bFGF (*basic fibroblast growth factor*) (20ng/ml, Sigma) y PDGF α (*platelet-derived growth factor alpha*) (20ng/ml, Sigma) y NT3 (Neurotrofina 3) (2ng/ml, Sigma), buscándose primar la proliferación de progenitores de oligodendrocitos. Los medios se cambiaron cada 2 días.

Tabla 6: Composición del medio formulado para favorecer la diferenciación oligodendroglial

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN	CASA COMERCIAL
DMEM/F12 con L-glutamina y 15mM HEPES	--	Gibco
Aminoácidos no esenciales	100 μ M	Gibco
HEPES	2mM	Sigma
D-Glucosa	30 mM	Gibco
Albúmina de suero bobino (F5)	0,00%	Gibco
Piruvato sódico	1mM	Gibco
Glutamina	2mM	Gibco
Penicilina/estreptomicina/Fungizona	1X	Gibco
Suplemento N2	1X	Gibco
Progesterona	300ng/ml	Sigma
Selenito sódico	30 ng/ml	Sigma

Posteriormente, se sustituyó el medio anterior por el medio formulado con la misma base pero suplementado con 2% suero fetal bovino (Gibco, Invitrogen) y triyodotirona (T3) (30 ng/ml, Sigma), para favorecer la diferenciación de las células.

En el caso de células en monocapa, estas fueron sembradas a una densidad de 5000cél/cm² en placas de 96 pocillos recubiertas con poli-D-Lisina hasta alcanzar una confluencia alta. Se mantuvieron en primer medio de diferenciación 7 días, y luego se cambió por medio con suero durante otros 7 días.

Para las células en esfera, éstas fueron disgregadas y sembradas a 2000 cél/cm² sobre cubreobjetos recubiertos con Matrigel. Se dejaron proliferar en el primer medio con los factores de crecimiento apropiados hasta que alcanzaron una confluencia de alrededor del 80% y entonces se mantuvieron 7 días en medio con suero.

Finalmente, las células fueron destinadas a inmunocitoquímica y/o aislamiento de RNA según lo descrito más adelante.

4. TÉCNICAS *IN VITRO*

4.1. Citometría de flujo

24h tras la extracción de células utilizando el protocolo que incluye un gradiente de sacarosa, se procedía al análisis de la población A2B5⁺ mediante citometría de flujo. Tras un primer lavado con PBS 0'1M, las células se incubaban con sobrenadante del hibridoma A2B5 durante 30 min a 4°C; después se lavaban con PBS 0'1M con 0'5% de albúmina de suero bovino 3 veces, y se incubaba durante 30 minutos con el anticuerpo Alexa Fluor 488® (1:50, en PBS 0'1M) en presencia de yoduro de propidio. Tras un último lavado las muestras fueron analizadas mediante el citómetro de flujo Cytomics FC 500 de Beckman Coulter.

4.2. Ensayo de β -galactosidasa asociada a senescencia

Las células fueron sembradas en cubreobjetos recubiertos de Poli-D-Lisina. Cuando alcanzaron una confluencia aproximada del 65%, fueron lavadas con PBS 0'1M, y fijadas con una solución (2% paraformaldehído (Panreac) 0.2% glutaraldehído (ANAME)) durante 10 min. a 37°C. Las células fueron lavadas 3 veces con PBS 0'1M 3 por 5 minutos, y puestas a incubar a 37°C en un agitador con agitación suave con una solución de tinción (125 ng/mL X-Gal, 20 mM ácido cítrico, 12'5 mM de ferrocianuro potásico (K₄[Fe(CN)₆]·3H₂O), 12'5 mM de ferrocianuro potásico (K₃[Fe(CN)₆], 375 mM NaCl y 5mM MgCl₂). Como el tiempo de incubación puede variar de 2 a 16 horas, las muestras se fueron controlando cada media hora hasta observar la aparición de color azul al menos en el control positivo, correspondiente a la

actividad de la hipotética enzima β -galactosidasa, que se supone que se acumula en las células senescentes.

4.3. Inmunocitoquímica

Las células adherentes fueron sembradas y expandidas en cubreobjetos recubiertas con Poli-D-Lisina en el caso de células adherentes; o sembradas en cubreobjetos con Matrigel™ durante una noche para la adhesión de las células en esfera. El tratamiento fue distinto en función del antígeno. Los anticuerpos utilizados en las inmunocitoquímicas se detallan en la **tabla 7**.

Tabla 7. Anticuerpos usados para inmunocitoquímica

	anticuerpo	animal	uso	referencia
PRIMARIOS	anti-A2B5	ratón	Sobrenad.	Clon105 (ATCC)
	anti-O4	ratón	1:200	MAB345 (Millipore)
	anti- GFAP	conejo	1:200	Z0334 (Dako)
	anti- Vimentina	ratón	1:200	ab8978 (Abcam)
	Anti-MAP2	ratón	1:200	M4403 (Sigma)
	Anti-SOX2	cabra	1:25/1:50	AF2018 (R&D)
	Anti-MBP	rata	1:100	M9434 (Sigma)
	anti- Ki67	conejo	1:250	ab66155 (Dako)
SECUNDARIOS	Texas Red anti-cabra	burro	1:150	705-075-147 (Jackson ImmunoResearch)
	Alexa Fluor 488 anti ratón IgM	cabra	1:500	A21042 (Invitrogen)
	Alexa Fluor 555 anti-cabra	burro	1:500	A31570 (Invitrogen)
	DyLight 488 anti-ratón	burro	1:500	715-485-150 (Jackson ImmunoResearch)
	Alexa fluor 488 anti conejo	burro	1:500	A21206 (Invitrogen)
	Alexa fluor 647 anti ratón	burro	1:500	A31571 (Invitrogen)
	Alexa fluor 488 anti rata	cabra	1:500	A21208 (Invitrogen)

4.3.1. Inmunocitoquímica general

Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% (Panreac). Se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) 0'1M, se incubaron durante 30 minutos en tampón de bloqueo (Triton X-100 0'2%, Suero de burro al 10% en PB 0'1M) y posteriormente se dejaron incubar toda la noche con el anticuerpo primario (anti-GFAP; Anti-Vimentina, anti-SOX2, anti-MAP2, anti-MBP).

Tras la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron varios lavados con PB 0'1M, y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente durante una hora y media. Tras los lavados con PBS, los núcleos fueron contrateñidos con DAPI y los cubreobjetos se montaron con "ProLong Gold antifade reagent" (Molecular Probes, Invitrogen).

4.3.2. Inmunocitoquímica *in vivo*

Las células vivas se lavaron con DPBS 0'1M, se incubaron durante 30 minutos en tampón de bloqueo (Suero de cabra al 5% en PBS 0'1M) a 4°C y posteriormente fueron incubadas con el anticuerpo primario (A2B5, O4) durante 45 min también a 4°C. Tras este periodo, se lavaron con DPBS 0'1M, se fijaron con PFA al 4% en PB 0'1M durante 10 minutos y se volvieron a lavar. La inmunotinción se continuó de forma rutinaria.

4.3.3. Inmunocitoquímica para el marcador Ki67

Las células con paraformaldehído al 4%, se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) 0'1M y se procedió a la recuperación del antígeno mediante tampón citrato sódico 10mM a pH 6.0. Se incubaron durante 30 minutos en tampón de bloqueo (Triton X-100 0'2%, Suero de burro al 10% en PBS 0'1M) y posteriormente se dejaron incubar toda la noche con el anticuerpo primario (anti-Ki67 1:250, Dako). La inmunotinción se continuó de forma rutinaria.

4.3.4. Adquisición de imágenes. Cuantificación.

Las imágenes fueron obtenidas mediante el microscopio confocal Leica TCS SP2 AOBS utilizando los objetivos adecuados. Las muestras se analizaron mediante la excitación correspondiente del fluoróforo: 405nm (DAPI), 488nm (Alexa Fluor 488, Dylight 488) y 561nm (Alexa Fluor 555, Texas Red) o 647nm (Alexa Fluor 647).

El análisis se realizó con la asistencia de un técnico especializado del servicio de microscopia confocal del Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia, y del servicio confocal del Campus de Medicina de Universidad Autónoma de Madrid.

Para la realización de recuentos, se analizaron al menos 10 fotografías correspondientes a 10 campos distintos de 2 experimentos independientes

para cada muestra. Aunque las imágenes mostradas en este trabajo resultan de la proyección de todos los planos capturados, la colocalización se analizó trabajando con los planos por separado.

4.4. Inmunohistoquímica

4.4.1. Seccionamiento del tejido

Pequeñas fracciones de lóbulo temporal de 4 muestras fueron fijadas con 4% PFA durante 24h. Los tejidos fueron crioprotegidos mediante su inmersión seriada en soluciones del 15% Sacarosa, 30% Sacarosa y 30% Sacarosa-50% OCT (Tissue-Tek™, Sakura) hasta que se hundieron. Las muestras fueron entonces encastradas para poder ser orientadas en un bloque de OCT congelado rápidamente usando hielo seco y etanol al 70%. Los cortes fueron realizados con un criostato modelo CM1520 (Leica). Los cortes quedaban adheridos en la cuchilla, eran recogidos y con la ayuda de un pincel eran estirados en portaobjetos tratados Ultrafrost (Thermo Scientific), poniendo dos cortes por portaobjetos.

4.4.2. Inmunohistoquímica fluorescente

Los cortes se lavaron PBS 0'1M, y se procedió a la recuperación del antígeno mediante tampón citrato sódico a 60°C 10mM a pH 6.0 durante 1h. Posteriormente se volvieron a lavar con PB 0'1M y se realizaron incubaciones con lavados con PB 0'1M- Tritón X-100 0'2%. Se procedió al bloqueo de la autofluorescencia. Realizando 6 lavados con etanol 70°, incubando 10 min. a temperatura ambiente con Negro Sudán (Sigma-Aldrich) al 1% en etanol de 70° y retirando el exceso de colorantes con lavados de alcohol al 70%. Tras nuevos lavados con PB 0'1M, se incubaron durante 1h en tampón de bloqueo (Suero de burro al 10% en PBS 0'1M) y posteriormente se dejaron incubar toda la noche con los anticuerpos primarios correspondientes (**tabla 8**) en tampón bloqueo a 4°C.

Al día siguiente, se realizaron varios lavados con PB 0'1M, y se incubaron con anticuerpo secundario correspondiente durante 1h 30min a temperatura ambiente. Tras los lavados con PB 0'1M, los núcleos fueron contrateñidos con

DAPI y los cubreobjetos se montaron con “ProLong Gold antifade reagent” (Molecular Probes, Invitrogen).

Tabla 8. Anticuerpos usados para inmunohistoquímica

	ANTICUERPO	ANIMAL	USO	REFERENCIA
PRIMARIOS	anti-SOX2	cabra	1:25/1:50	MAB2018 (R&D)
	anti-CNPasa	ratón	1:200	C5922 (Sigma)
	anti-GFAP	ratón	1:200	Ab8975(Abcam)
	anti- NeuN	ratón	1:200	MAB377 (Chemicon)
	Anti-Olig2	conejo	1:200	AB9610 (Chemicon)
	Anti-IBA1	conejo	1:250	019-19741 (Waco)
SECUNDARIOS	Texas Red anti-cabra	burro	1:150	705-075-147 (Jackson ImmunoResearch)
	Alexa Fluor 555 anti-cabra	burro	1:500	A31570 (Invitrogen)
	DyLight 488 anti-ratón	burro	1:500	Jackson ImmunoResearch
	Alexa fluor 488 anti conejo	burro	1:500	A21206 (invitrogen)
	Alexa fluor 647 anti ratón	burro	1:500	A31571 (Invitrogen)

4.4.3. Adquisición de imágenes. Cuantificación.

Las imágenes fueron obtenidas mediante el microscopio confocal Leica TCS SP2 AOBS (Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia) y Olympus FV1000 (Universidad de Valencia) utilizando los objetivos adecuados. Las muestras se analizaron mediante la excitación correspondiente del fluoróforo: 405nm (DAPI), 488nm (Alexa Fluor 488 ó Dylight 488) y 561nm (Alexa Fluor 555, Texas Red).

El análisis se realizó con la asistencia de un técnico especializado del servicio de microscopia confocal correspondiente. La colocalización se analizó trabajando con los planos por separado.

4.5. Microscopia electrónica de transmisión

Las células fueron sembradas en placas de 4 pocillos de Permanox (Nunc), fijadas con 3'5% de glutaraldehído en tampón fosfato (PB) 0'1M durante 30 minutos a temperatura ambiente, y luego lavadas 3 veces en PB 0'1M. Las células fueron postfijadas en 2% de tetraóxido de osmio durante 2 horas, deshidratadas, e incluidas en Araldita (Durcupan, Fluka).

El resto de procesamiento y adquisición de imágenes fueron realizados en el servicio de microscopía electrónica del Centro de Investigación Príncipe Felipe. Se realizaron cortes semifinos de 1 μm , con una cuchilla de vidrio, y se tiñeron con azul de toluidina (Panreac, España) al 1%. Las fotografías se tomaron en un microscopio Nikon Eclipse 800.

Posteriormente, a partir de los cortes semifinos se realizaron cortes ultrafinos (60-70nm) con una cuchilla de diamante, se tiñeron con citrato de plomo, y fueron examinados usando un microscopio electrónico modelo FEI Tecnai Spirit.

5. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES

5.1. Extracción de ARN y cuantificación

Parte de células adherentes despegadas de la placa con Triple Express (Gibco, Invitrogen), o esferas en el caso de cultivo flotante, fueron empleadas para la extracción de ARNm utilizando el “RNeasy micro Kit™” (QUIAGEN™, Invitrogen™), de acuerdo a las instrucciones del fabricante, seguido de un tratamiento posterior con DNase I (QUIAGEN™). El ARN fue utilizado inmediatamente o conservado a -80°C hasta su utilización.

La concentración y la pureza del ARN extraído se determinó mediante un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). La ausencia de ADN genómico se comprobó mediante la realización de PCR (Paq5000 DNA Polymerase, Stratagene™) con un cebador correspondiente a un gen control (GAPDH).

5.2. RT-PCR (PCR con transcripción inversa)

5.2.1. Síntesis de ADNc: Transcripción inversa

La síntesis de ADNc utilizando se realizó el “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit™” (Applied Biosystems™), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se emplearon para las reacciones los cebadores hexámeros aleatorios y una cantidad de alrededor de 100 ng de ARN para un volumen final de 20 μl . El ADNc fue mantenido a -20°C hasta su posterior uso. Reacciones sin ARN fueron usadas como control negativo.

La concentración del ADNc se determinó mediante un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). La calidad del ADNc se comprobó mediante la realización de PCR (Paq5000 DNA Polymerase, Stratagene™) con un cebador correspondiente a gen control (GAPDH).

5.2.2. Diseño de cebadores y validación.

Se diseñaron cebadores específicos para marcadores de células madre y de linaje astrocitario, neuronal y oligodendroglial. Para ello, las secuencias fueron sacadas de la base de datos de la Universidad de California, Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgNear>). Se escogió la zona 3'UTR para el diseño de los cebadores, dada su alta variabilidad entre genes. Las secuencias fueron introducidas en el programa Primer3 (disponible en <http://frodo.wi.mit.edu/>), y se diseñaron parejas de cebadores que amplificaran zonas de alrededor de 100-200 pares de bases, siempre tratando de minimizar el riesgo de formación de dímeros consigo mismo o su pareja. Posteriormente se procedió al análisis mediante BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para comprobar si los cebadores únicamente se unían al gen/ADNc objetivo. Para validarlos, se usó información bibliográfica para comprobar aquellos tipos de muestras que nos sirvieran como control positivo. La lista completa de cebadores puede consultarse en la **tabla 9**.

Tabla 9: Cebadores empleados para el estudio por PCR

símbolo del gen	Nombre del gen	cebadores	tamaño amplicón (pares de bases)	control positivo
B2M	Beta-2-microglobulina	CTCGCGCTACTCTCTCTTTCTG	335	-----
		GCTTACATGTCTCGATCCCACT		
ABCG2	ATP-binding cassette sub-family G member 2	GGGTTCTCTTCTTCTGACGACC	389	U87
		TGGTTGTGAGATTGACCAACAGACC		
BM1	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog	GGAGACCAGCAAGTATTGTCCCCTTTTG	320	U87
		CATTGCTGCTGGGCATCCGTAAG		
CD133	Prominin 1	TCTCTATGTGGTACAGCCG	350	U87
		TGATCCGGGTCTTACCTG		
GFAP δ	Glial fibrillary acidic protein isoform delta	AGTGGTAAAGGTGGTGAGTCCT	126	human GBM
		GTCCAGGCACAGCGAGAC		
MELK	<i>Maternal embryonic leucine zipper kinase</i>	CTTGGATCAGAGGCAGATGTTTGAG	248	human GBM
		GTTGTAATCTTGCATGATCCAGG		

Tabla 9: Cebadores empleados para el estudio por PCR (continuación)

MSI1	Musashi-1	GATGGTCACTCGGACGAAGAA	149	human GBM
		CAAACCTCTGTGCCTGTTG		
NES	Nestina	GAGAGGGAGGACAAAGTCCC	251	U87
		TCCCTCAGAGACTAGCGCAT		
NOTCH1	Notch1	GCCGCCTTTGTGCTTCTGTTC	251	human GBM
		CCGGTGGTCTGTCTGGTCGTC		
PAX6	Paired box gene 6	TGACCTCGTATCTCTTTTCAGC	92	U87
		AACCTTTTTCTTACCGTGTGATT		
SOX2	Sex determining region Y-box 2	GCACATGAACGGCTGGAGCAACG	206	human GBM
		TGCTGCGAGTAGGACATGCTGTAGG		
VIM	Vimentin	GCTTTCAAGTGCCTTTCTGC	97	U87
		AAATCTTGTAGGAGTGTCGGTTG		
CD44	CD44	AGAAGGTGTGGGCAGAAGAA	116	U87
		AAATGCACCATTTCCTGAGA		
GFAP α	Glial fibrillary acidic protein isoform alpha	TGCGGTCCCTTCTTACTCAC	232	U373
		CCTCCCAGTCCCATCTCTG		
S100B	S100 calcium binding protein B	TGCGAGTTCTGATGGAGTTG	160	
		TGCGAGTTCTGATGGAGTTG		
TUBB3	Beta- III tubulin	GAGGAAGAGGGCGAGATGTA	166	U87
		GAGGGGAAAGCAGGGTGT		
MAP2	Microtubule-associated protein 2	ATTCCGAGGTTCCAACACAC	102	
		ACCAGCCATTGAAGAAATGC		
PDGFRA	Platelet-derived growth factor receptor subunit alpha	ATAATCCCCACAGGCACATT	118	human oligodendrogloma tissue
		TCACACATTACCACACCATT		
NG2	Chondroitin Sulfate Proteoglycan	GCTGTGTGGTGTTTGTGTCT	229	
		TGAACTGAAGGGGTTTGGTC		
PLP/DM 20	Myelin proteolipid protein/DM20 isoform	TGAACTGAAGGGGTTTGGTC	247/142(*)	
		GCGACTACAAGACCACCATCT		
CNP	2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase	CAGGACCGCCAAAGAATG	172	
		GGAAAGGAGGGGAGTGAGAC		
OLIG1	Oligodendrocyte transcription factor 1	GTCTTCCTTCTCGCCGTCTT	159	
		GGCTACTACCAACAACCAAAACC		
OLIG2	Oligodendrocyte transcription factor 2	CGGCTTTCCTCTATTTTGGTT	139	
		GTTACACGGCAGACGCTACA		
MAG	Myelin-associated glycoprotein	TCCAGACACAAACCTCCAAA	127	
		ACACTTTCGTTTCAGCCATC		
MOG	Myelin oligodendrocyte protein	TGAAGGGAAGGAAGAGGAAGA	89	
		GGTTTGGGTTGGGGCTAC		
MBP	Myelin basic protein	TCCAGACACAAACCTCCAAA	227	
		ACACTTTCGTTTCAGCCATC		

5.2.3. Amplificación del ADNc (RT-PCR)

La reacción de PCR se llevó a cabo empleando 1 µl de una dilución del ADNc sintetizado en el paso anterior, empleando la enzima ADN polimerasa Pq5000 (Stratagene™), y una concentración 10uM de cada uno de los cebadores de la pareja escogida de la pareja 1. Reacciones sin ADNc fueron usadas como control negativo para detectar contaminaciones.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler®, (Eppendorf) con el siguiente programa.

1. 94°C / 5 min (1 ciclo)
2. 94°C / 15 seg.; Tm 60 °C / 20 seg.; 72°C / 30 seg (34 ciclos)
3. 72°C / 10 min (1 ciclo)

El producto de la reacción se conservó a 4°C hasta el momento de realizar la electroforesis.

5.2.4. Análisis del producto de la RT-PCR

Para el análisis de los productos de la RT-PCR se realizó una electroforesis en gel de 1'8% agarosa en presencia de bromuro de etidio, a un voltaje de 80V (8V/cm) hasta que el frente de electroforesis alcanzó una separación adecuada según el marcador de pesos molecular (Promega) y el azul de bromofenol (Promega) presente en el tampón de carga que se agregaba al producto de PCR. La visualización de las bandas de los fragmentos de ADN amplificados y su fotografía se llevó a cabo en un transiluminador de luz UV (Bio-Rad) usando el programa QuantityOne (Bio-Rad).

5.3. PCR a tiempo real

La cantidad de ARNm correspondiente al gen SOX2 se midió mediante PCR a tiempo real y relativizada a la cantidad de mensajeros de dos genes de control (β -2- microglobulina y GAPDH).

La calidad y eficiencia de los cebadores se comprobó mediante la construcción de curvas estándar a diferentes concentraciones para cada gen, utilizando ADNc de células U373.

Se llevaron a cabo 2 experimentos independientes con cada reacción por duplicado, empleando al menos 100 ng de ADNc de muestra y SYBR Green I Master (Roche) en placas de 48 o 96 pocillos (Roche). El termociclador empleado fue el Light Cycler 480 de Roche, y con el software correspondiente fueron analizados los resultados. Para determinar las cantidades relativas, se emplearon rectas patrón calculadas previamente mediante diluciones seriadas de muestras de ADNc sintetizado a partir de muestras de líneas tumorales comerciales (**tabla 10**).

Tabla 10: Cebadores y rectas patrón de genes analizados por PCR a tiempo real

Gen	Cebadores	Recta patrón	umbral
<i>GAPDH</i>	TCCTCCACCTTTGACGCTG	$y = -3,5385x + 17,858$	4,555
	ACCACCCTGTTGCTGTAGCC		
<i>ACTB</i>	TTCTACAATGAGCTGCGTGTG	$y = -3,8386x + 14,593$	1,6620
	GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA		
<i>B2M</i>	CTCGCGCTACTCTCTCTTTCTG	$y = -3,6384x + 20,363$	1,7262
	GCTTACATGTCTCGATCCCACT		
<i>SOX2</i>	GCACATGAACGGCTGGAGCAACG	$y = -3,6014x + 21,613$	3,6762
	TGCTGCGAGTAGGACATGCTGTAGG		

5.4. Aislamiento de ADN y cuantificación

Se procedió al aislamiento de ADN de células adherentes de la muestra 1 en pases 1, 3, 5, 7, y 10 usando el kit comercial DNeasy Blood & Tissue Mini Kit (Quiagen). La concentración de ADN se cuantificó utilizando NanoDrop ND1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware USA), obteniendo siempre valores de ADN total superiores a 1 µg/ml. La integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

5.5. Hibridación Genómica Comparativa

Para el análisis de hibridación genómica comparada sobre Micromatriz/ microarrays de ADN, se utilizó el 'Human Genome CGH Microarray 44K, ref.: G4426B-014950' de Agilent Technologies (Palo Alto, California, USA) 800 ng de ADN genómico se hibridó frente a la referencia de su mismo sexo sobre estos microarrays siguiendo el protocolo del fabricante 'Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis, protocol Version 4.0'. Para la extracción de los datos de la imagen del microarray se utilizó el software

Feature Extraction 9.5.3.1 de Agilent con normalización por el método de Loess siguiendo el protocolo de Agilent para estos arrays 'CGH-v4_95_Feb07' y los controles de calidad de la hibridación 'CGH_QCMT_Feb08'. En el análisis de los datos se utilizó 'DNA Analytics 4.0' de Agilent, las regiones de aberración estadísticamente significativas se determinaron por medio del algoritmo ADM-2 con un umbral de 6.0 con un mínimo de tres sondas alteradas. Los resultados se corrigieron manualmente para eliminar falsos positivos detectados e incluir falsos negativos no detectados por el algoritmo.

6. ESTADÍSTICA

Los datos aparecen expresados como media \pm desviación típica.

El estudio estadístico para comparar el porcentaje de células Ki67⁺ fue realizado con el software SPSS mediante el test estadístico ANOVA. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con $p < 0.05$.

El análisis estadístico para comparar los niveles de ARNm de SOX2 fue realizado usando un test de Kruskal-Wallis seguido de una comparación de Mann-Whitney con la corrección *post hoc* de Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con $p < 0.05$.

RESULTADOS

1. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DE LAS MUESTRAS QUIRÚRGICAS

Un total de 37 muestras de tejido temporal humano usadas para este trabajo fueron obtenidas de pacientes intervenidos de lobectomía e hipocampectomía en el departamento de Neurocirugía del Hospital La Fe (Valencia).

Únicamente se utilizaron muestras de aquellos pacientes que presentaban esclerosis mesial temporal fármacoresistente. Se descartaron aquellas muestras que correspondían a otras alteraciones epileptogénicas como displasias corticales, puesto que podrían interferir con las conclusiones finales del proyecto.

Como primera aproximación, con el objetivo de descartar aquellos pacientes que presentaran alteraciones severas de la sustancia blanca, se utilizaron las imágenes con tensor de difusión (resonancia magnética) del estudio preoperatorio para comparar la región anterior del lóbulo temporal que iban a ser usadas en los experimentos posteriores (por ser la más alejadas del foco epiléptico, el hipocampo) con regiones equivalentes del lóbulo contralateral (**figura 5**).

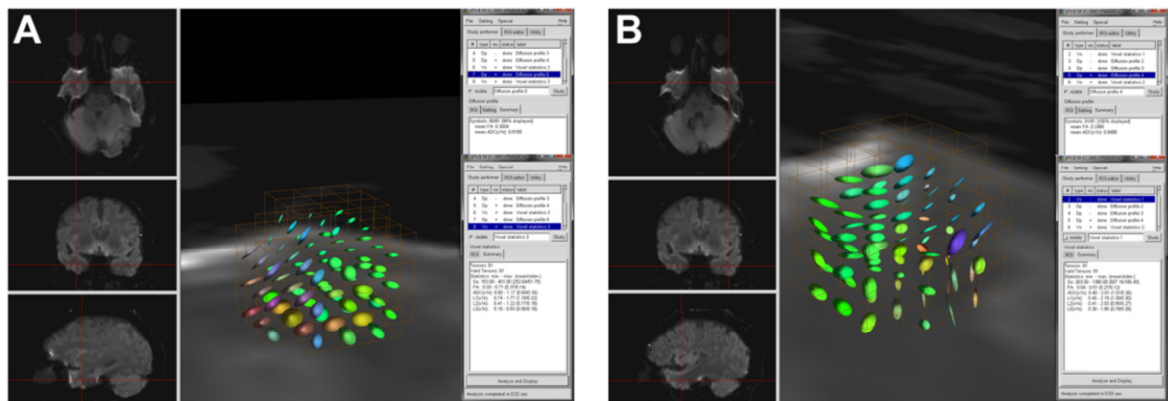


Figura 5: Ejemplo de análisis por MRI realizado usando el programa *DTV.II SR toolbox*. (A) Los vóxeles fueron elegidos de acuerdo al área correspondiente a la muestra de tejido con la que se realizarían el resto de experimentos, y usados para calcular los parámetros AF y ADC. (B) Para comparar, el mismo número de vóxeles fue situado en un área equivalente del lado contralateral.

Mediante el programa *DTV.II SR toolbox* (*Image Computing and Analysis Laboratory (UTRAD/ICAL) Department of Radiology, The University of Tokyo Hospital, extension of Volume 1, package* (<http://www.volume-one.org/>)) se dispusieron el mismo número de vóxeles en ambas zonas y se calcularon los valores mínimos, máximos y medios de anisotropía fraccional (FA) y coeficiente de difusión aparente (ADC). Estos valores, que son una medida de la direccionalidad de las moléculas de agua y, por tanto, pueden ser correlacionados con la integridad de los haces de mielina de la sustancia blanca, mostraron valores similares en ambos lados.

Para asegurar la ausencia de anomalías a nivel celular, se llevó a cabo un estudio histopatológico en el laboratorio. Este análisis venía a complementar el estudio histopatológico realizado por el servicio médico, que confirmó el diagnóstico inicial, y describió una citoarquitectura normal o con una moderada gliosis. Mediante inmunohistoquímica para el marcador neuronal NeuN, se comprobó la ausencia en todos los casos de desorganización cortical difusa, pudiéndose delimitar las capas del córtex adyacente, así como la ausencia prácticamente total de heterotopia neuronal en la sustancia blanca (**figura 6**).

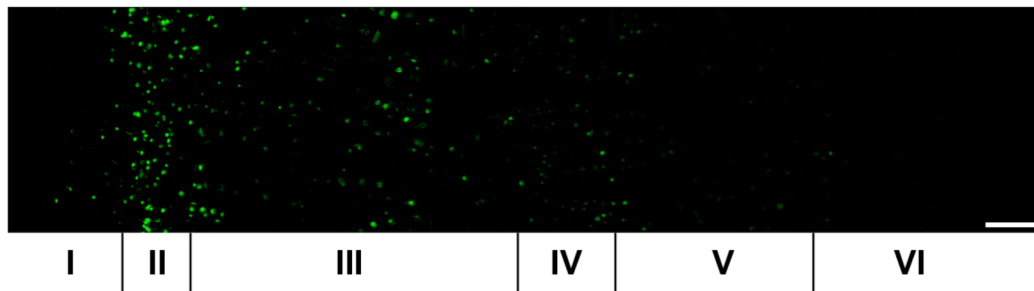


Figura 6: Reconstrucción de la corteza de una de las muestras con inmunotinción para el marcador NeuN. Las capas pudieron ser delimitadas correctamente en todas las muestras. La barra de escala corresponde a 50 μ m

De igual manera, mediante inmunotinción contra la proteína IBA1, se comprobó la ausencia de microglía activada. Las células microgliales presentaban expansiones celulares largas, delgadas y ramificadas, cuerpo celular pequeño, y se conservaban la distancia entre ellas propia del estado quiescente (**figura 7**).

Finalmente, también se realizaron recuentos automatizados de células KI67 positivas mediante el sistema Benchmark ULTRA, usando el clon 30-9 (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Las imágenes fueron interpretadas con el escáner iScan Coreo y el algoritmo Virtuoso (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). El conteo reveló que el número de células presentes en fases activas del ciclo celular en el tejido era normal, descartando la ausencia de proliferaciones neoplásicas como las observadas en las muestras de glioma humano usadas como control (**figura 8**).

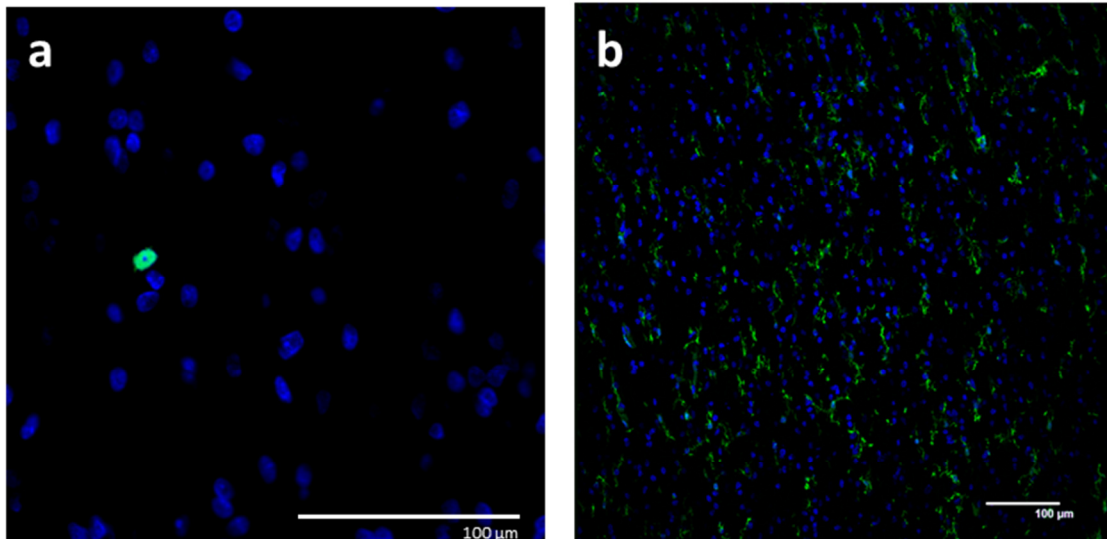


Figura 7: Tinciones inmunocitoquímicas contra el marcador NeuN (a) y la proteína microglial Iba-1(b). (a) En el primer caso, se descartó la presencia de heterotopia neuronal generalizada, con cosas muy aislados de neuronas en la sustancia blanca. (b) Las células microgliales presentaron una morfología consistente con el estado en reposo y aparecían distribuidas por todo el parénquima, sin observarse acúmulo. Las barras de escala representan 100 μm .

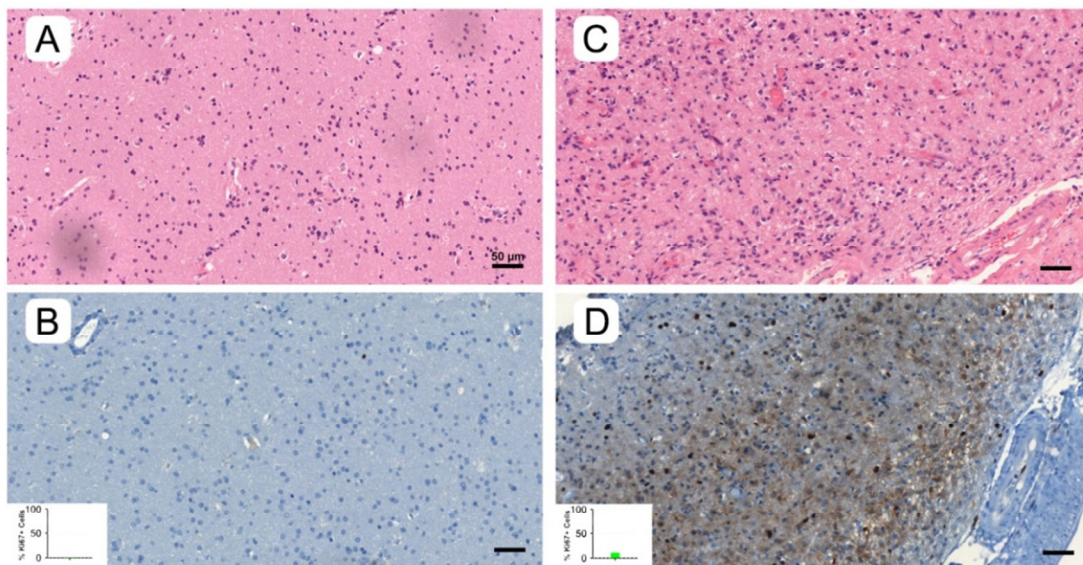


Figura 8: Recuentos de células KI67⁺ realizados usando inmunohistoquímica seguida de una interpretación mediante un algoritmo digital automatizado. La imagen representa un ejemplo de una muestra de sustancia blanca y un control de glioma teñidos con hematoxilina-eosina (a y c, respectivamente) e inmunotinción contra KI67 (b y d, respectivamente). Las barras de escala representan 50 μm .

2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS OBTENIDAS USANDO EL PROTOCOLO ESTÁNDAR

2.1. Aislamiento y cultivo primario de las células obtenidas con el protocolo estándar

Un total de 14 muestras fueron procesadas de acuerdo al protocolo establecido previamente para el aislamiento de progenitores gliales de sustancia blanca (Roy y col., 1999), así como para la obtención de CMN de hipocampo (Roy y col., 2000) y ZSV humana (Ayuso-Sacido y col., 2008). Siguiendo esta técnica, fuimos capaces de obtener 4 cultivos primarios de células proliferativas viables, lo que supone un porcentaje de éxito bastante bajo (28,57%), pero muy similar al obtenido por otros grupos.

En el cultivo inicial (pase 0), el medio era sustituido cada 3 días, centrifugando el sobrenadante del cultivo con el disociado 5 min a 1200 rpm, y resuspendiéndolo en medio nuevo con factores, durante las primeras 2 semanas. Pasado este periodo, gradualmente se iba sustituyendo el medio por medio nuevo, con el fin de eliminar los restos celulares del cultivo.

Durante ese estado se comenzaban a ver pequeñas colonias de células adheridas proliferando, además de un gran número de células diferenciadas, de mayor tamaño, sin capacidad de división. Generalmente al mes del procesado, las colonias habían tapizado un gran porcentaje de la superficie de la placa de cultivo, por lo que se procedía a su pase (pase 1): se levantaban las células usando Triplex™, se contaba el número de viables, y se sembraban a una densidad de 2000 células/cm² (figura 9).



Figura 9: Imagen en contraste de fases de una colonia de células proliferantes de la sustancia blanca aisladas con el protocolo estándar a los 14 días de la extracción (A); tras el primer pase, a densidades medias (B) y a alta densidad (C) Barra de escala = 100µm.

Las células pudieron ser subcultivadas por este método durante 7 pases, y en el caso de la muestra 1, hasta 10 pases.

Previamente se había publicado la posibilidad de crecer células de parénquima cerebral humano durante al menos dos años, con períodos de criopreservación y descongelación (Ayuso-Sacido y col., 2008). Sin embargo, nos preguntamos si dichas células podían mantenerse en cultivo durante un elevado número de pases conservando además su estabilidad genética. Para contestar a esta cuestión llevamos a cabo una caracterización a lo largo de los pases en cultivo acompañada de un análisis de posibles alteraciones cromosómicas.

2.2. Caracterización de las líneas primarias

2.2.1. Caracterización morfológica

Las células obtenidas con este protocolo tenían una morfología de tipo fibroblástico, con forma de huso. Sin embargo, al microscopio óptico de transmisión se observaban cambios morfológicos a lo largo de los pases en cultivo. Las células aumentaban de tamaño y perdían la simetría lineal inicial. (**figura 10**).

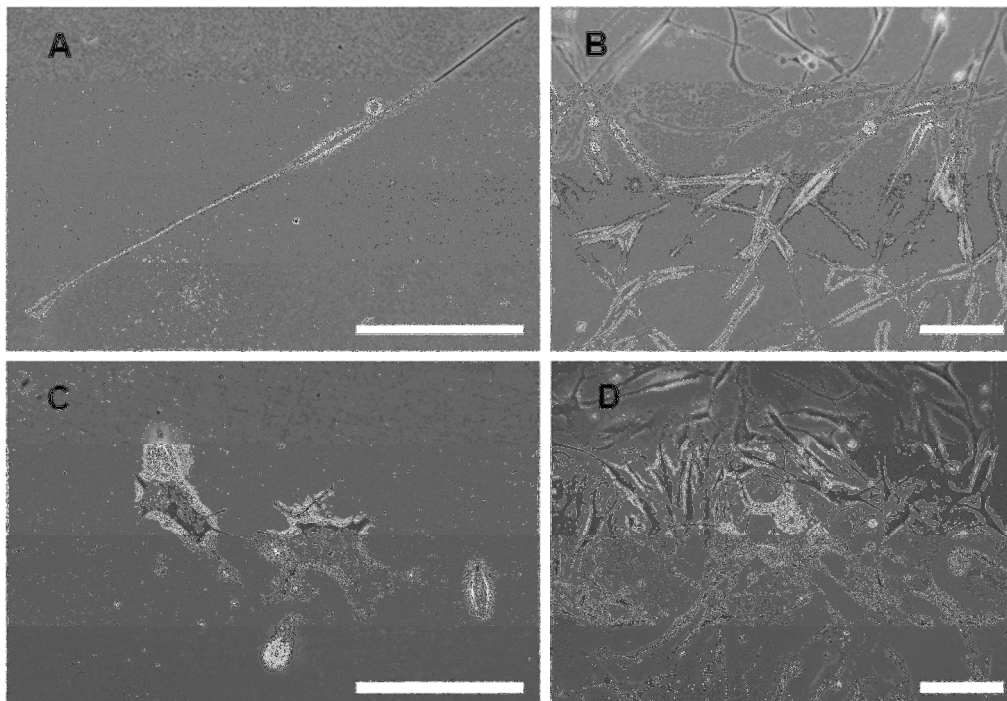


Figura 10: Imágenes de contraste de fases de células en cultivo en pase 3 (A-B) y en pase 7(C-D). Las barras de escala representan 50 μm (C, D).

Con objeto de estudiar dichos cambios morfológicos con mayor grado de detalle, células de un pase temprano (pase 3) y otras de un pase final (pase 7 y 10) de las muestras 1 y 2 fueron sembradas y analizadas mediante microscopia electrónica.

En los cortes semifinos, se podía comprobar que las células de pases tempranos presentan una morfología alargada con escaso citoplasma, núcleos grandes, cromatina laxa y nucléolos prominentes. Además, al microscopio electrónico de transmisión presentan abundante citoesqueleto, vesículas claras, aparatos de Golgi bien desarrollados y ocasionales fibras de estrés, comunes en las células en cultivo debido a las tensiones mecánicas, con el fin de mejorar la adhesión a la superficie de la placa. Durante los primeros pases no observamos diferencias significativas entre las dos muestras analizadas. A medida que aumentaban los pases en cultivo se confirmó el aumento observado de la relación citoplasma/núcleo (**figura 11**).

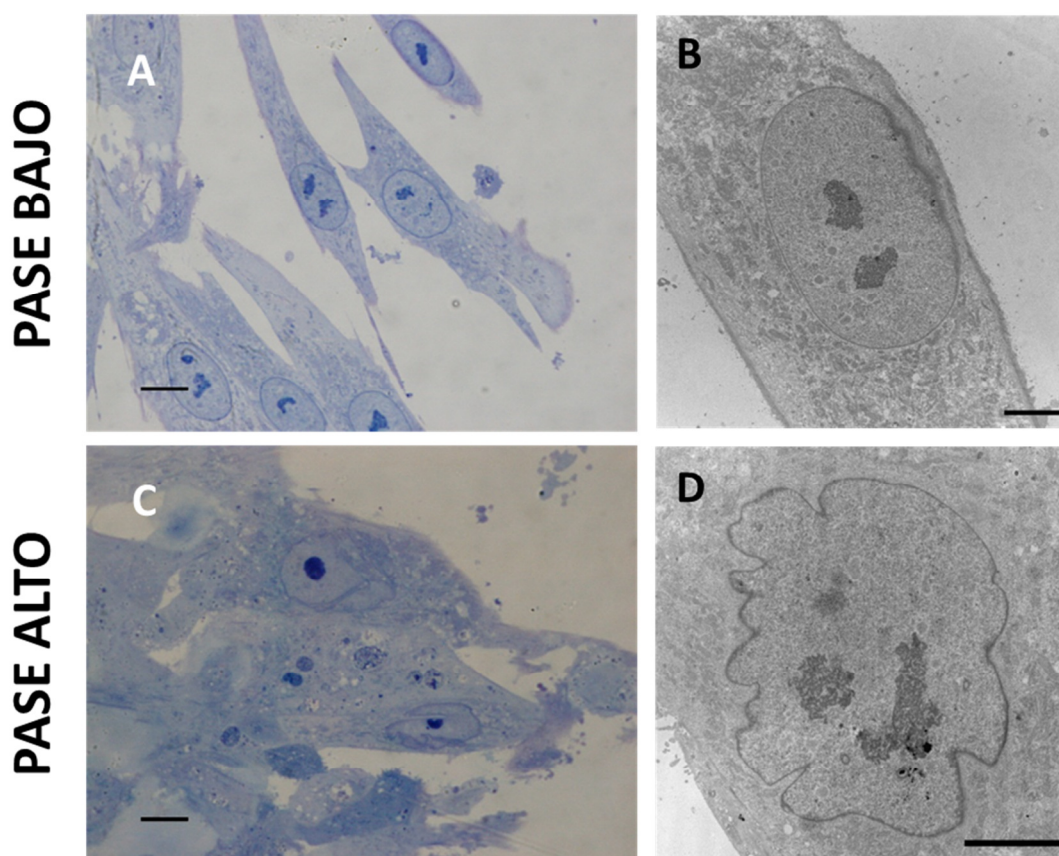


Figura 11: Análisis morfológico de células progenitoras aisladas de la sustancia blanca comparando células en pases bajos de cultivo (A, B) y pases altos (C, D). Las imágenes muestran cortes semifinos teñidos con azul de toluidina (A, C), y detalles de la morfología nuclear en cortes ultrafinos observados al microscopio electrónico, que se veía alterada tras el tiempo en cultivo (B, D). Barras de escala de 10 µm A, B, C, y de 5 µm para D.

Se observan además un considerable aumento de fibras de estrés y vesículas claras al microscopio electrónico (**figura 12**). Por último, también destaca la aparición de alteraciones en la envoltura nuclear: mientras que en pases tempranos se observa un contorno de membrana nuclear liso, en pases altos aparecen invaginaciones nucleares.

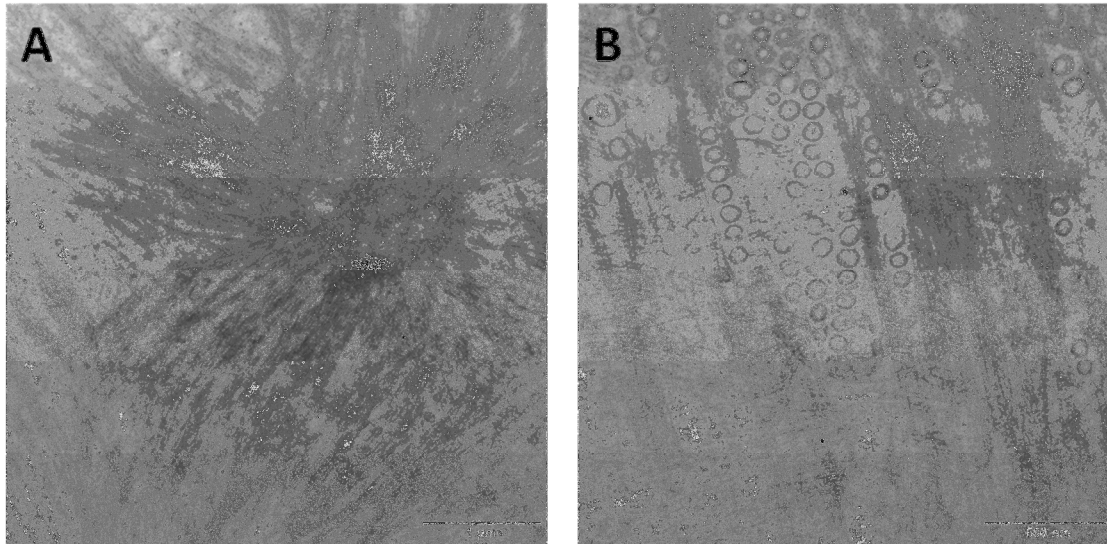


Figura 12: Detalles observados por microscopía electrónica de las células en cultivo. Se observó una importante acumulación de fibras de estrés con los pases en cultivos (figura A), y también vesículas claras (figura B).

2.2.2. Cuantificación de las células Ki67⁺ lo largo de los pases.

Ensayo de senescencia

La observación experimental apuntaba a un descenso de la tasa proliferativa *in vitro*, de forma que en los pases altos se requería de mayor tiempo para alcanzar una confluencia total partiendo del mismo número de células iniciales, llegando un pase en el cual el cultivo entraba en quiescencia/senescencia y no progresaba.

Para cuantificar la capacidad proliferativa de estas células a lo largo de los pases en cultivo, se llevó a cabo un análisis de la presencia de Ki67 mediante inmunocitoquímica (figura 2B), comparando para ello células correspondientes a pases más tempranos (hasta pase 4) con células en pases más tardíos (hasta su parada de proliferación), para 3 líneas celulares. El recuento de células positivas indica un descenso estadísticamente significativo en el porcentaje de células que siguen en fases activas del ciclo celular a lo largo de los pases, tanto para la muestra 1 (un diferencia de alrededor del 19,1% entre células Ki67⁺ entre pases bajos y altos) como para la muestra 2 (10,1%) y la muestra 3 (29,05%) (**figura 13**).

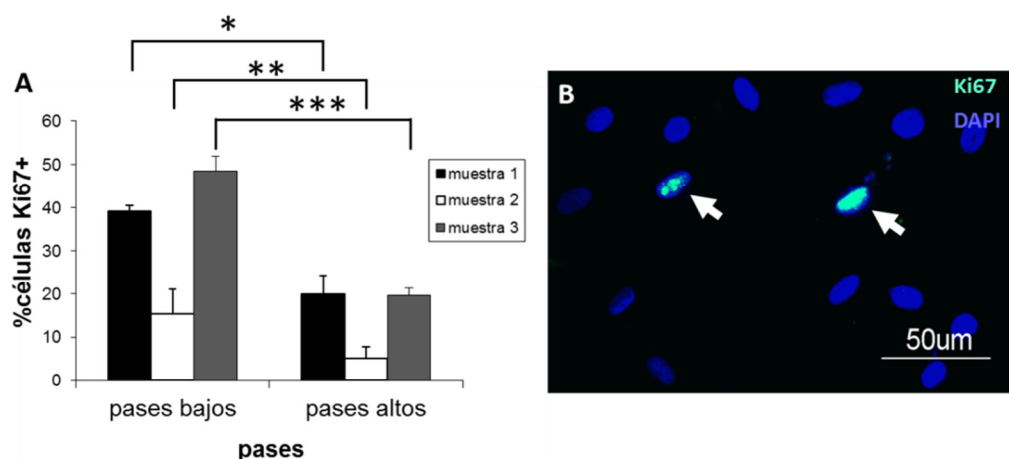


Figura 13. Cuantificación de la capacidad proliferativa de células progenitoras aisladas del parénquima subcortical. A. Histograma donde se muestra la cuantificación de células positivas para Ki67 a lo largo de los pases en cultivo. Pases bajos hace referencia a pases entre 1 y 4, pases altos hace referencia a pases entre 5 y entrada en senescencia (* P-valor = 0,00064; **P-valor = 0,0000076; *** P-valor = 0,001) B. Inmunocitoquímica contra Ki67 contrateñidos con DAPI (las flechas blancas señalan células positivas para Ki67).

Sin embargo, aún quedaba por determinar si las células cesaban su proliferación por entrar en un estado de senescencia o quiescencia. Aunque ambas condiciones comportan el mismo resultado, la senescencia es un fenómeno programado e irreversible, la quiescencia es dependiente de los estímulos del ambiente y se considera reversible.

Por este motivo, se llevó a cabo una tinción S-gal, que detecta la presencia de beta galactosidasa asociada a la senescencia (Dimri y col., 1995). Para ello, se usaron muestras de células en pase bajo (pase 3) y células en el último pase conseguido de los 3 cultivos celulares. Como control positivo, usamos células de una línea comercial de fibroblastos. La tinción no reveló la presencia de células senescentes en nuestras muestras, por lo que deducimos que las células dejan de progresar en el ciclo y multiplicarse no debido a un agotamiento (senescencia) sino a una parada de respuesta a los estímulos (**figura 14**).

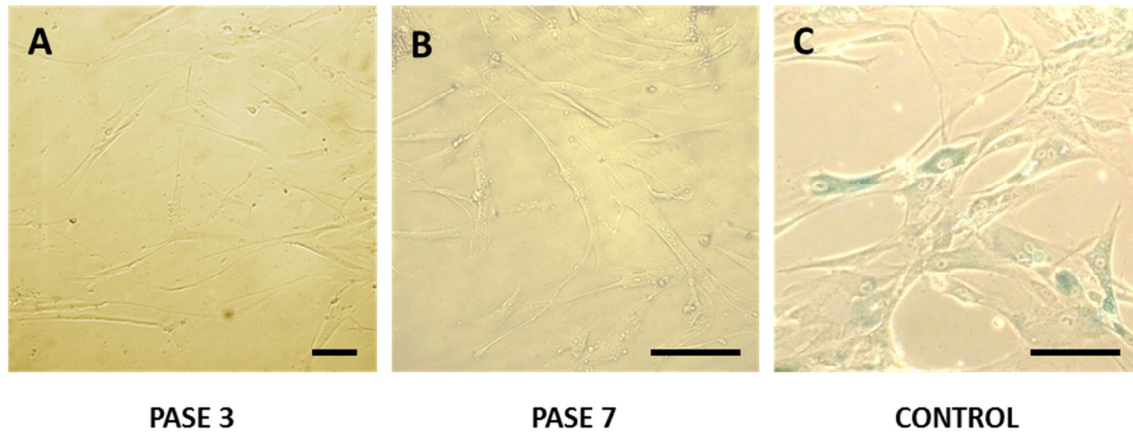


Figura 14. Análisis de la presencia de células senescentes mediante tinción de la β -galactosidasa para células en pases tempranos (A) y pases tardíos (B). No se observaron células positivas (con precipitado azul). Una línea comercial de fibroblastos fue usada como control positivo (C). Barra de escala = 50 μ m.

2.2.3. Análisis de la estabilidad genética

Con objeto de estudiar posibles alteraciones cromosómicas debidas a las condiciones de cultivo o a inestabilidad genómica intrínseca de las células, se llevó a cabo un análisis por Hibridación Genómica Comparativa de muestras de ADN obtenidas a partir de pases alternos de la muestra 1 desde el comienzo (pase 1) hasta el pase 10. Paralelamente, en el mismo experimento se incluyeron muestras de 3 líneas celulares derivadas de muestras de glioblastoma aisladas en nuestro laboratorio.

Los resultados muestran que, a diferencia de las células tumorales, las células de parénquima cerebral humano mantienen una cantidad estable de ADN a lo largo de los subcultivos. Sin embargo, se observa que en el pase 10 un 40% de la población presenta una duplicación del cromosoma 10 coincidiendo con el momento en que la capacidad proliferativa se reduce drásticamente (**figura 15**).

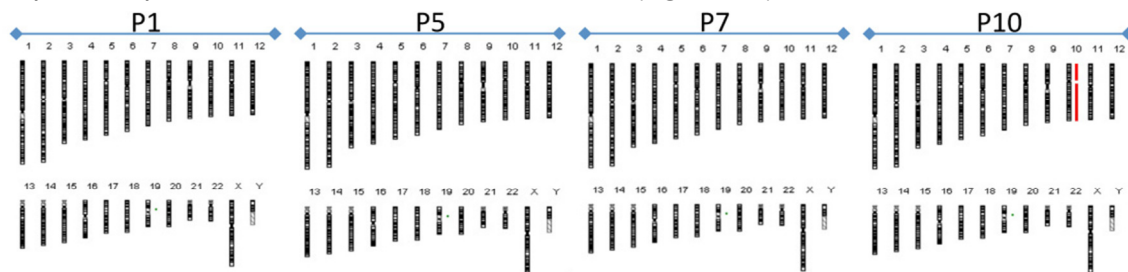


Figura 15. Ideograma representando los resultados de la hibridación genómica comparativa para ADN extraído de una muestra a lo largo de los pases. Se observa la aparición de una duplicación de cromosoma 10 en el pase final estudiado (representado mediante una línea roja al lado del cromosoma correspondiente del ideograma), y que aparecía en un 40% de la población.

2.2.4. Caracterización molecular

Además de establecer que las células aisladas y cultivadas bajo las condiciones descritas no podían mantenerse más allá de 7/10 pases en cultivo, nos preguntamos también sobre la identidad de las mismas.

Para contestar esta cuestión diseñamos una colección de cebadores específicos para analizar la expresión de marcadores de células madre y de linaje neural. Estos fueron validados usando como control positivo ADNc sintetizado a partir de ARN extraído de líneas comerciales de glioblastoma, así como de líneas primarias tumorales derivadas en laboratorio y de muestras de glioblastomas y oligodendroglioma en las que estuviera descrita la presencia de dicho marcador.

Aislamos ARN procedente de las tres muestras cada dos pases en cultivo y estudiamos la expresión de dichos marcadores mediante RT-PCR. Para dicho aislamiento se probaron dos kits comerciales, uno de uso estándar y otro recomendado para un número menor de células. Éste último permitía aislar mayores concentraciones de ARN total de acuerdo con la cuantificación posterior, y por tanto fue el método usado rutinariamente.

2.2.4.1 Análisis de marcadores de célula madre

En primer lugar estudiamos el patrón de expresión de marcadores de indiferenciación. En cuanto a marcadores correspondientes a proteínas de superficie, estudiamos la presencia del transportador de membrana *ABCG2* (*ATP-binding cassette sub-family G member 2*), expresado *in vitro* por células madre neurales y cuyo papel parece estar relacionado con la homeóstasis para permitir una función celular correcta (Islam y col., 2005; Schumacher y col., 2012). Del mismo modo, la glicoproteína de membrana CD133, conocida también como Prominina-1 (*PROM1*), ha sido empleada para el aislamiento de células madre neurales de tejido fetal (Uchida y col., 2000), y se ha detectado su presencia en el nicho neurogénico de los ventrículos laterales, aunque es discutido si es expresado en el epéndimo o bien por las expansiones que emiten al ventrículo los astrocitos subyacentes a esta capa endimaria (Corti y col., 2007; Coskun y col., 2008; Mirzadeh y col., 2008).

También se decidió estudiar los marcadores de citoesqueleto nestina (NES) y vimentina (VIM), utilizados habitualmente para la identificación de células madre neurales (Lendahl y col., 1990; Morshead y col., 1994; Messam y col., 2000), así

como la isoforma GFAP delta (*Glial fibrillary acidic protein*), asociada más recientemente a un fenotipo indiferenciado (van den Berge y col., 2010).

Por último, también se incluyeron proteínas con una funcionalidad clara en la biología de las células madre neurales. La proteína BMI1 (siglas del inglés *B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog*) regula la auto-renovación, apoptosis y la diferenciación de células madre/progenitoras *in vivo* e *in vitro* (Molofsky y col., 2003; Wang y col., 2010b). Los factores de transcripción NOTCH1, SOX2 y PAX6 (*Paired box gene 6*) están implicados en el mantenimiento de células madre neuronales y en la regulación gliogénesis/ neurogénesis, y durante el desarrollo de mamíferos, se encuentra expresado en las zonas ventricular y subventricular, así como en neuroesferas en cultivo (Irvin y col., 2001; Corbin y col., 2008; Gomez-Lopez y col., 2011). La proteína MELK (*Maternal embryonic leucine zipper kinase*) ha sido relacionada con el regulación de la autorenovación de las células madre neurales (Nakano y col., 2005). Por último, durante el desarrollo temprano del sistema nervioso Musashi 1 (MSI1) promueve la salida del ciclo celular y la diferenciación neuronal y bloqueando la gliogénesis, mediante la activación entre otros genes de NeuroD (Farah y col., 2000; Nieto y col., 2001).

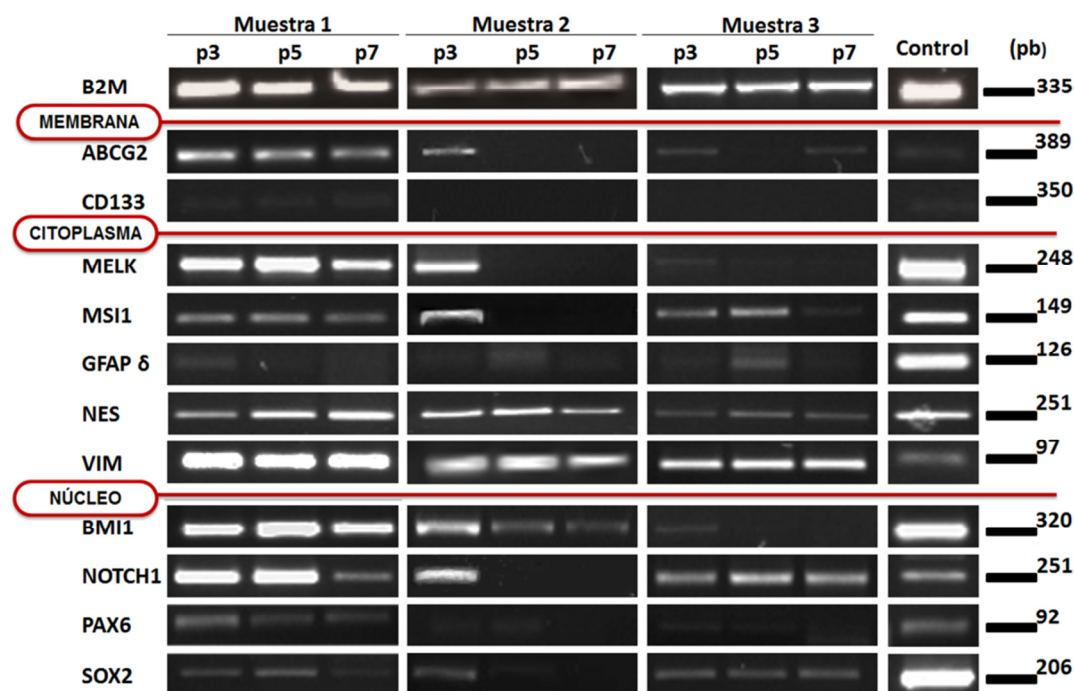


Figura 16. Análisis de expresión mediante RT-PCR de diferentes marcadores moleculares relacionados con el fenotipo indiferenciado para los pases 3, 5 y 7 de células cultivadas en monocapa, aisladas según el protocolo estándar. Los patrones de expresión se han analizado con referencia al gen de control β 2-microglobulina.

Los resultados aparecen recogidos en la **figura 16**. Destaca la expresión de *vimentina* en todas las muestras. También observamos la expresión de *ABCG2*, *BMI1*, así como de *SOX2*, *Nestina*, *NOTCH1*, *Mushashi-1* y la variante *GFAP δ* en todas las muestras, lo que confirmaba la presencia de una población de células que expresaban marcadores de progenitores neurales en las tres muestras. La expresión de *PAX6* se detectó en todas las líneas, pero eran apenas imperceptibles en la muestras 2 y 3. Por último, sólo se detectó una débil expresión de *CD133* en la muestra 1.

En cuanto a la evolución tras los sucesivos subcultivos, en la muestra 2 se produce un mayor número de pérdida de marcadores en los pases finales: *ABCG2*, *MSI1*, *PAX6*, *SOX2*, *MELK* y *NOTCH1*. En la muestra 3 también se deja de detectar *PAX6*, además de *BMI1* y *MELK*.

2.2.4.2 Análisis de marcadores de linaje neural.

A continuación nos preguntamos si la entrada en quiescencia/senescencia en pases altos podría ser consistente con una diferenciación de las células proliferativas. Para contestar a esta pregunta realizamos un análisis de expresión de marcadores moleculares específicos de neurona, astrocito y oligodendrocito mediante RT-PCR a lo largo de todos los pases en cultivo hasta alcanzar el estado de senescencia.

En las tres muestras analizadas se detectó la expresión del marcador astrocitario temprano *CD44* y la isoforma alfa de *GFAP*, aunque no se encontró la expresión del mensajero de la proteína de unión a calcio *S100B* (**figura 17**). No se observaron variaciones con el tiempo en cultivo.

Además, ambas muestras presentaron la expresión de los marcadores de neurona/neuroblastos, tanto de β *III tubulina* (*TUBB3*) como de *MAP2* (*Microtubule-Associated Protein 2*), que se mantuvieron a lo largo de los pases en cultivo (figura 13). No se detectó la expresión del ARNm correspondiente a la proteína de migración neuronal *Doblecortina* (*DCX*).

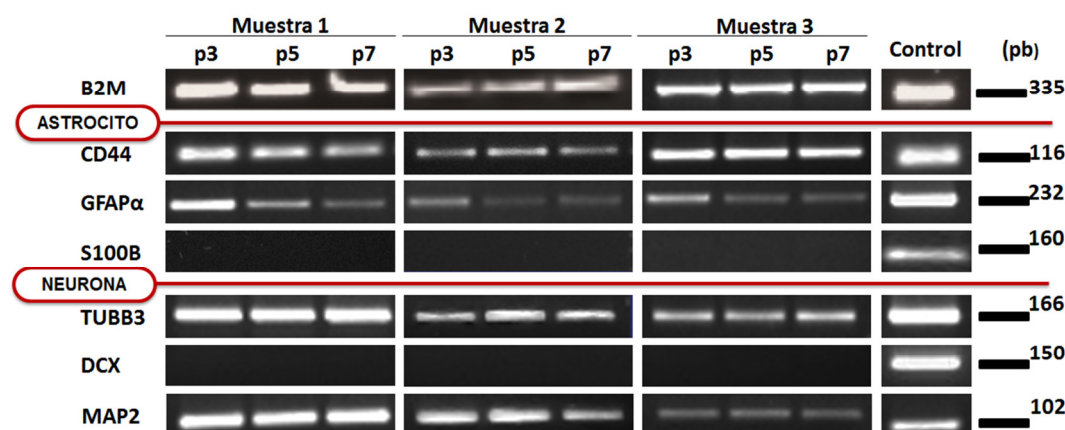


Figura 17. Análisis de expresión mediante RT-PCR de diferentes marcadores moleculares relacionados con el linaje astrogliar y neural para pases 3, 5 y 7 de células cultivadas en monocapa, aisladas según el protocolo estándar. Los patrones de expresión se han analizado con referencia al gen control β 2-microglobulina.

Con respecto a la expresión de marcadores específicos del linaje oligodendroglial, las tres muestras expresaron el marcador de progenitores de oligodendrocitos *PDGFRα* (*Alpha-type Platelet-Derived Growth Factor Receptor*), y también *NG2* (*Chondroitin sulfate proteoglycan 4*). Observamos además una leve expresión de la isoforma *DM20* (Dickinson y col., 1996) del gen *PLP* (*proteolipid protein*) en la muestra 1, ausente en las otras dos muestras.

Cuando estudiamos la expresión de marcadores tempranos en la diferenciación a oligodendrocitos, observamos la presencia de *CNP* (*2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase*) en las tres muestras. Sin embargo, no se detectó la expresión de los factores de transcripción *OLIG1* y *OLIG2*, necesarios para la diferenciación oligodendroglial (Jakovcevski y Zecevic, 2005a), ni de marcadores correspondientes a estadios finales de la diferenciación a oligodendrocitos maduros como *MAG* (*Myelin Associated Glycoprotein*) o *MOG* (*Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*). Únicamente se detectó la expresión de *MBP* (*Myelin Basic Protein*) en los tres pases estudiados de la muestra 3, aunque existen isoformas que son expresadas en estadios de diferenciación más tempranos (Givogri y col., 2001) (**figura 18**).

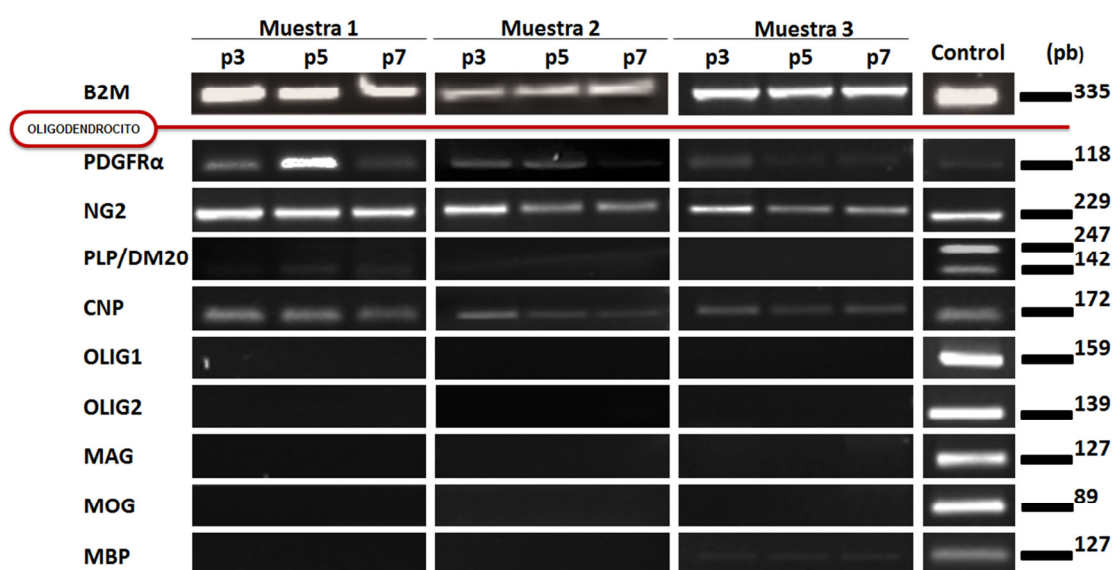


Figura 18. Análisis de expresión mediante RT-PCR de diferentes marcadores moleculares relacionados con el linaje astrogial y neural para pases 3, 5 y 7 de células cultivadas en monocapa, aisladas según el protocolo estándar. Los patrones de expresión se han analizado con referencia al gen de mantenimiento β 2-microglobulina.

2.2.5. Caracterización inmunocitoquímica

Se sembraron células de pases tempranos sobre cubreobjetos recubiertos con Poli-D-Lysina, y cuando visualmente alcanzaron una confluencia en torno al 80%, fueron fijadas con PFA al 4%.

Se realizó inmunocitoquímica contra los marcadores de indiferenciación Vimentina, así como para los marcadores astrocitarios GFAP, el marcador neuronal temprano MAP2 y los marcadores de preoligodendrocito O4 y A2B5. Como resultado, obtuvimos que virtualmente todas las células eran positivas para el marcador Vimentina (**figura 19**), mientras que no se detectaba la presencia ni de marcadores de oligodendrocito, astrocito o neurona. Este mismo resultado se obtuvo tanto en las células de los pases iniciales de cultivo como células en pases finales. Nos encontramos, pues, con una población que mantiene la expresión de un marcador de indiferenciación, vimentina, pero que no expresa ni llega a expresar ningún marcador de ninguna de las líneas neurales.

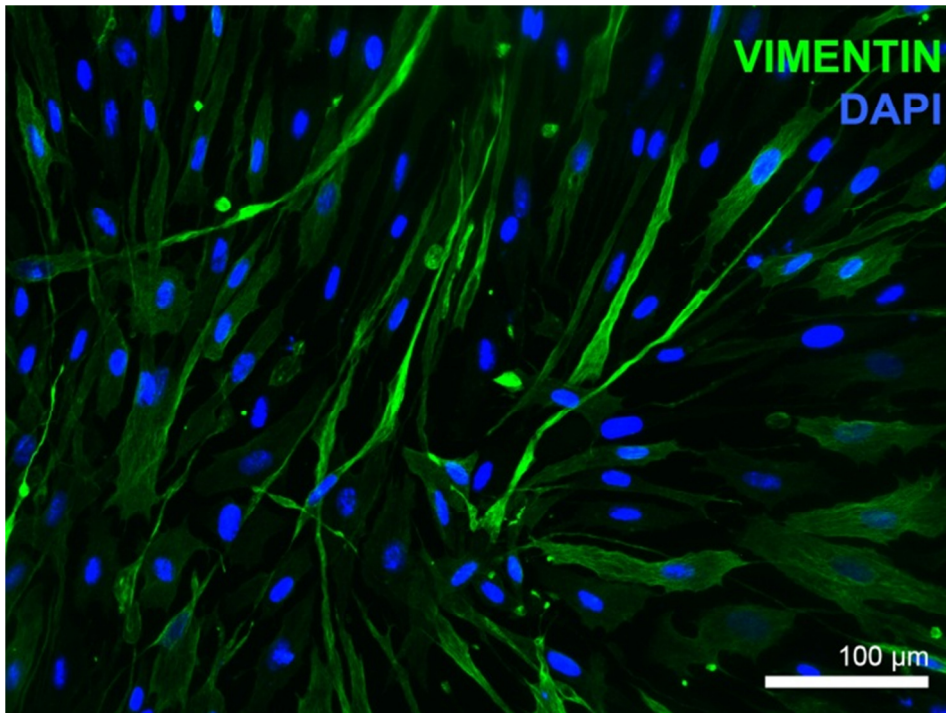


Figura 19: Inmunocitoquímica de fluorescencia de células en pase 3 para el marcador de citoesqueleto vimentina- Alexa 488 (verde). Los núcleos aparecen contrateñido con DAPI.

Así pues, mediante la utilización del protocolo estándar fuimos capaces de aislar una población celular que puede ser expandida un número limitado de pases hasta alcanzar un estado de quiescencia, y que parece encontrarse bloqueada en un estado de indiferenciación

3. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS USANDO UN PROTOCOLO OPTIMIZADO

3.1. Aislamiento y caracterización de las muestras obtenidas usando un protocolo optimizado

Dada la limitada disponibilidad de muestras frescas de tejido cerebral humano, y el pequeño número de células que se consigue de cada una de ellas, la optimización de la metodología empleada para su aislamiento se ha convertido en un paso fundamental. Además, los estudios anteriores sugieren que el conjunto de células progenitoras de oligodendrocito de la sustancia blanca adulta no está compuesto por una población homogénea, sino que está constituido por diferentes subpoblaciones caracterizadas por la expresión de uno o varios marcadores, más o menos coincidentes entre sí. Por tanto, la introducción de nuevas técnicas de purificación de progenitores abre la puerta a la búsqueda de nuevas subpoblaciones de células con características y capacidades potencialmente diferentes.

En este contexto, añadimos un paso final en el protocolo de aislamiento de CPOs que consiste en una centrifugación en gradiente generado por sacarosa, tal y como aparece descrito en Johansson y col (1999) para el aislamiento de células madre neurales. Básicamente, el homogeneizado de tejido ya filtrado se resuspende en una solución de sacarosa al 30% en una mezcla al 50% de HBSS sin calcio ni magnesio y agua destilada. La solución se centrifuga durante 10 minutos a 750g, y como resultado las células quedan en el fondo del tubo, mientras que los restos celulares y de mielina generados por la digestión y la disgregación mecánica quedan flotando en su superficie debido a su menor densidad. (**Figura 20**).

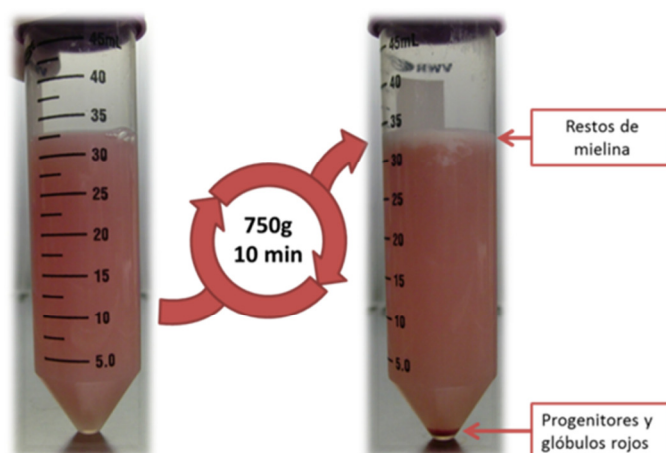


Figura 20: Resultado de la resuspensión del disgregado celular en la solución de sacarosa tras la disgregación mecánica (A) y la separación del pellet celular y los restos de mielina tras la centrifugación (B).

Gracias a la introducción de este paso, se obtuvieron cultivos viables en todas las muestras procesadas (23 muestras), lo que supone un gran avance comparado con el 23,84% de éxito obtenido usando el protocolo estándar.

Sorprendentemente, a la semana del aislamiento utilizando este último paso, se observó que en lugar de colonias adheridas a la superficie de la placa de cultivo, se obtenía una población celular que formaba colonias en forma de grupos esféricos. Se trataban de células más pequeñas, de forma redondeada. Por lo tanto, la centrifugación en la solución de sacarosa no estaba actuando únicamente como método de eliminación de restos celulares, sino que tenía un efecto importante sobre el tipo celular obtenido tras el protocolo de aislamiento. El mecanismo más probable por el que puede ocurrir este fenómeno es una selección debido a la densidad celular, como se discutirá en el apartado correspondiente.

Durante las dos primeras semanas en cultivo, las colonias aparecían débilmente adheridas a la superficie, de forma que podían ser despegadas mediante un simple pipeteo. Conforme las células crecían parte de las esferas quedaban en suspensión y otra parte se mantenía pegada a la placa. En torno a las 3 semanas, antes de que el interior de la esfera se oscureciera debido a la necrosis celular, las esferas fueron disgregadas mecánicamente usando pipetas *pasteur*, y sembradas a una densidad de 3000 cél/cm². Densidades inferiores no fueron capaces de generar cultivos viables. Mediante este método, se pudieron llevar a cabo 2 pases más, hasta conseguir esferas terciarias, sin embargo, su número y tamaño disminuía con los pases. Este hecho, junto con la necesidad de una mayor densidad de siembra para obtener cultivos viables respecto a las células en monocapa, apunta hacia una menor capacidad de auto renovación (**figura 21**).

Además, estas colonias esféricas eran capaces de generar un cultivo monocapa en cada pase, que se expandía adherido a la placa. Estas células presentaban características morfológicas similares a las células obtenidas con el protocolo estándar. Cuando se procedía al pase de las esferas, ya que estas quedaban adheridas a la placa, estas células podían ser levantadas usando TrypLE™ Express y propagadas de forma separada durante al menos 5 pases con el mismo procedimiento y densidades que los usados con las células obtenidas con el protocolo estándar (**figura 21 C**).

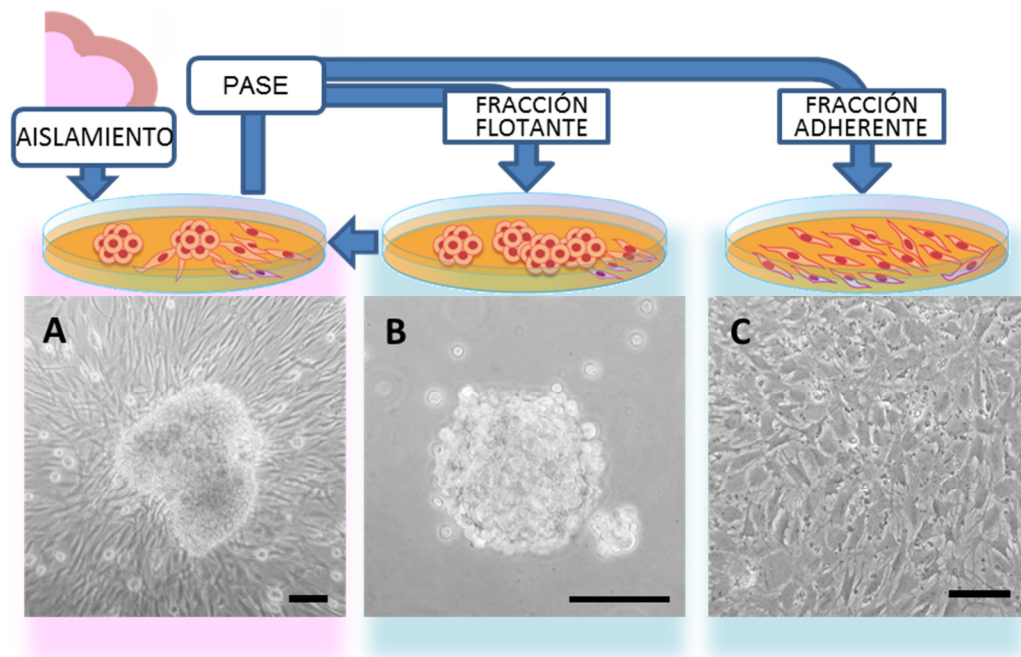


Figura 21. Fotografías de contraste de fases de los cultivos obtenido tras la optimización del protocolo de aislamiento. El cultivo inicial generaba esferas, generalmente adheridas levemente a la placa, que daban lugar a un cultivo adherente. Tras el pase, las células podían separarse en una fracción que crecía en esfera (B), que con el tiempo, volvía a producir la misma situación inicial, y otra fracción que crece de forma adherente y que podía ser subcultivada independientemente. Barra de escala: 50 μ m.

En algunas muestras de esferas, sobre todo en los pases finales, se observaba que las esferas tendían a permanecer adheridas más fuertemente a la superficie de la placa de cultivo, lo que iba acompañado de un menor crecimiento del tamaño de las esferas. Por ello, se procedió a su levantamiento mediante pipeta bajo microscopio invertido de cultivo, y las esferas fueron sembradas en placas de baja adherencia, con lo que comenzaban a expandirse de nuevo.

3.2. Caracterización de las células en esfera y adherentes

3.2.1. Análisis de la expresión de marcadores de indiferenciación

Como primera aproximación se volvió a realizar un análisis de la expresión de marcadores de células madre/progenitoras usando el mismo grupo de cebadores diseñados y ADNc sintetizado a partir de ARN obtenido de 3 muestras de esferas diferentes en pase 1 y ARN de células adherentes en pase 3 obtenidas a partir cada una de ellas.

En términos generales, las 3 muestras de esferas y las 3 muestras adherentes eran bastante similares entre sí (**figura 22**). Por el contrario, al comparar ambos tipos de muestras se observan diferencias en el patrón de expresión de ARNm: mientras que sólo en las poblaciones de esferas se detectó la expresión de *CD133* y *GFAP*

delta, las células adherentes se diferenciaban de estas en la expresión de *ABCG2* y *MSI1*. El resto de marcadores eran compartidos, aunque, entre todos los marcadores considerados, destacaba especialmente la expresión de *SOX2* en las 3 muestras de esferas.

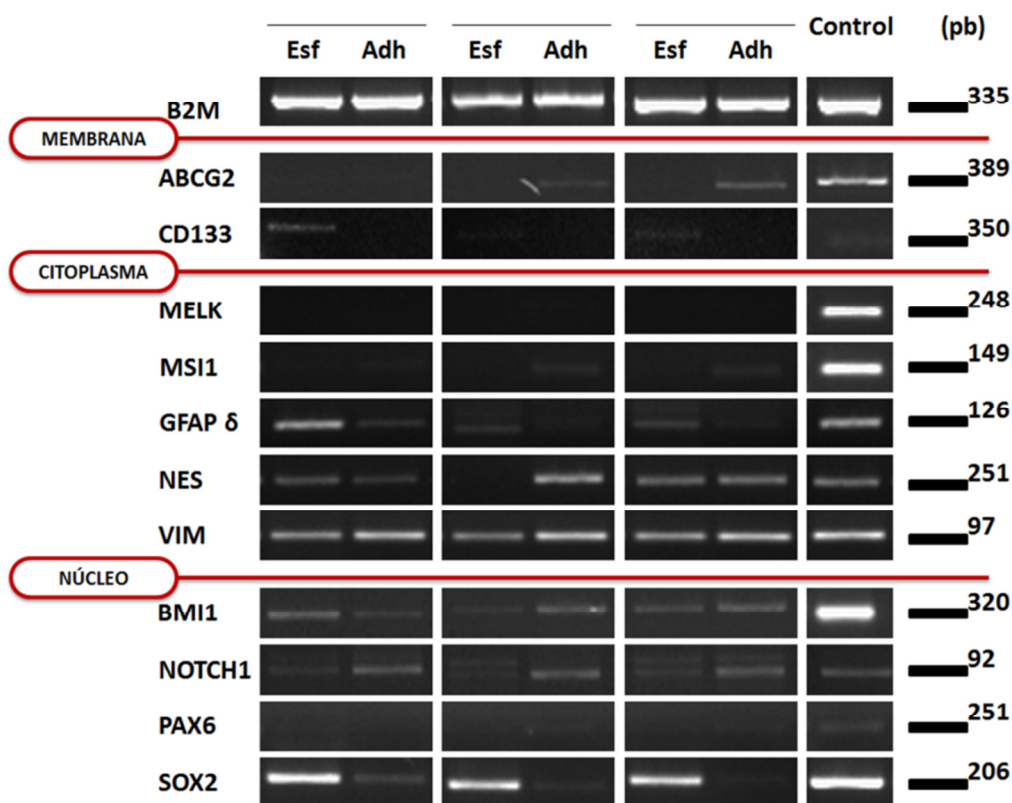


Figura 22: Análisis de expresión mediante RT-PCR de diferentes marcadores moleculares relacionados con el fenotipo indiferenciado para 3 cultivos de células que se expanden como esfera y sus correspondientes cultivos adherentes generados a partir de ellas. Los patrones de expresión se han analizado con referencia al gen de mantenimiento β 2-microglobulina.

3.2.2. Análisis de la expresión de SOX2

3.2.2.1. Análisis por PCR a tiempo real

Como la diferencia de expresión de *SOX2* resultaba interesante dado el papel de dicho gen en las células madre neurales, se llevó a cabo un análisis cuantitativo de la expresión de su ARNm mediante PCR a tiempo real para las muestras obtenidas por el protocolo estándar, para las células que crecen en esfera y las de monocapa derivadas de estas últimas, con objeto de confirmar los resultados obtenidos mediante RT-PCR.

En primer lugar se construyó una recta patrón. Se usaron para ello muestras de ARN extraídas de la línea de glioblastoma comercial U373. Se realizaron diluciones seriadas, se determinó el ciclo umbral correspondiente para cada una de ellas, y se usaron los valores obtenidos para determinar la ecuación de la recta de regresión que se utilizaría para inferir la cantidad relativa de *SOX2* y poder establecer comparaciones relativas.

El experimento confirmó un enriquecimiento en la expresión de *SOX2* en las muestras que formaban esferas: los niveles relativos de ARNm de *SOX2* eran en torno a 1000 veces mayores que en los cultivos adherentes del protocolo estándar ($0.557590283 \pm 0.366389743$ en las esferas frente a $0.000453344 \pm 0.000225462$ detectado en las células adherentes) y sobre 10 veces mayores que en el cultivo adherente derivado de ellas ($0.042446222 \pm 0.031808723$) (**Figura 23**).

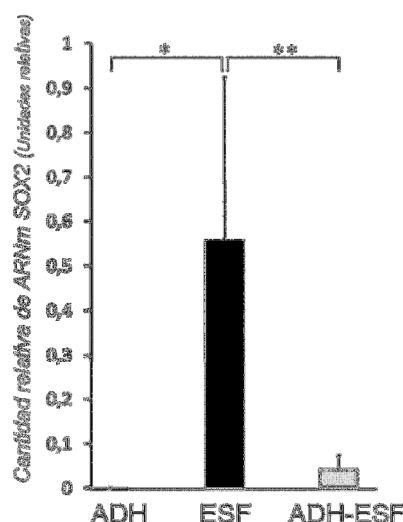


Figura 23: Cantidad relativa de ARNm del gen *SOX2* medida mediante PCR a tiempo real. Las barras representan media \pm desviación típica. El análisis estadístico se realizó mediante comparaciones 2 a 2 con el test de Mann Whitney con la corrección *post hoc* de Bonferroni. *(P-valor= $0.0068 < \alpha = 0.05$) ** (P-valor: $0.0091 < \alpha = 0.05$).

3.2.2.2. Análisis por inmunocitoquímica

Finalmente, se llevó a cabo la detección de la expresión por inmunocitoquímica. Se usaron como control positivo células de la línea U373, mientras que la línea celular U87 fue usada como control negativo. Para la detección en la muestra tumoral fue necesario utilizar el anticuerpo a una concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$, mientras que para las muestras de células de parénquima humano se requirió el doble (8 $\mu\text{g/ml}$).

El experimento reveló que únicamente había niveles detectables de la proteína *SOX2* en las esferas (**figura 24**). La tinción aparece limitada al núcleo, excepto en el caso de las células en división observadas en la línea U373, que se observa en el

citoplasma. 7 días tras el aislamiento, un $43,69 \pm 8,92\%$ de las células eran positivas, mientras que ese porcentaje incrementaba hasta un $80,57\% \pm 17,20\%$ en el primer pase. La explicación más plausible para este aumento es que en el cultivo inicial haya un conjunto de células no proliferantes que se pierden al realizar el subcultivo.

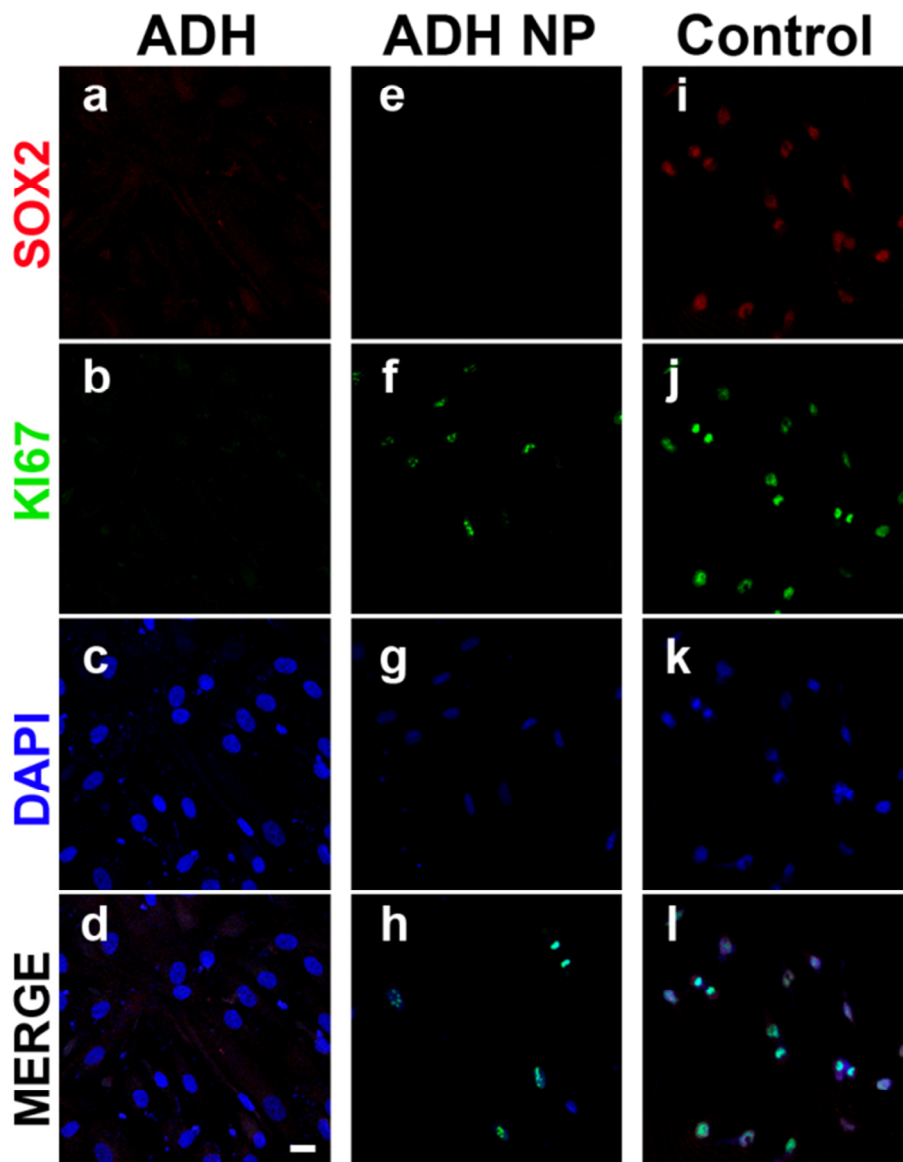


Figura 24: Inmunocitoquímica contra la proteína SOX2(rojo) y KI67 (verde) para células adherentes asiladas de acuerdo al protocolo estándar (ADH, a-d) y las células adherentes generadas por los cultivos de esfera (ADH NP, e-h). No se detectó SOX2 en ninguna de los dos tipos de células. Las células U373 fueron usadas como control positivo (Control, i-l), La barra de escala representa 20 μm .

La coinmunotinción con Ki67 para las células del primer pase muestra que todas las células Ki67⁺ de las esferas eran además SOX2⁺ (**figura 25**). El porcentaje de células Ki67⁺ eran $17,45 \pm 5,80\%$, inferior que en el resto de muestras adherentes, lo que se corresponde con la menor tasa de proliferación y la menor capacidad de pases que se pueden mantener el cultivo.

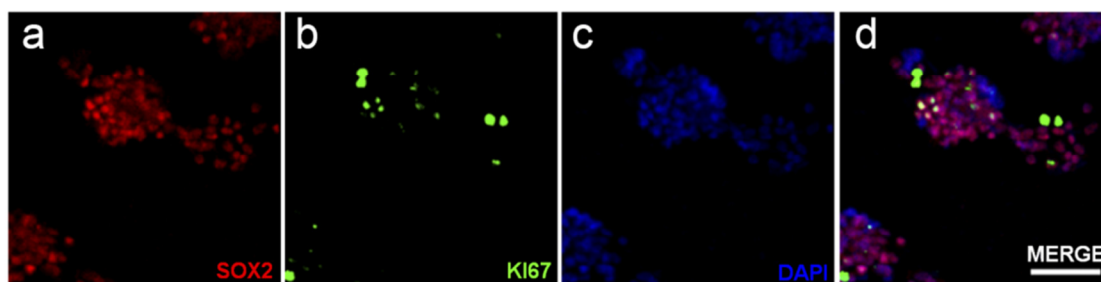


Figura 25: Inmunocitoquímica contra la proteína SOX2 (rojo) y Ki67 (verde) para células que se propagan como esferas flotantes, adheridas en Matrigel. La barra de escala representa 20 μm .

Otra cuestión que se planteó fue si las células adherentes originadas por los cultivos de esferas eran capaces de generar un cultivo en esfera. La idea surge a partir del trabajo presentado por Kukekov y col. (1997), en el cual se describe que a partir del disociado de cerebro de ratón se pueden obtener dos tipos de esferas: aquellas que surgen espontáneamente (esferas tipo I) y aquellas en las que es necesario añadir β -mercaptoetanol (esfera tipo II), un agente reductor de los puentes disulfuro que limita la adhesión al sustrato. 3 muestras diferentes de células adherentes aisladas directamente del cultivo de neuroesferas, es decir, sin subcultivo posterior por separado, fueron sembradas a una densidad de 3000 cél/cm² in placas de baja adherencia, en dos grupos diferentes: a unas se les añadía β -mercaptoetanol a una concentración de 100 μM , mientras que a otras no. Al cabo de una semana, parte de las células se mantenía viva y habían formado pequeños agregados celulares, sin observarse diferencias en el número de células en ambos grupos. No obstante, sí se observaban más restos celulares en las células con el agente reductor, indicando que podría estar resultando tóxico. Los agregados no crecían de tamaño, y al cabo de dos semanas, prácticamente la totalidad de ellos había degenerado. Las colonias supervivientes fueron cambiadas a placas con cubreobjetos recubiertos con Matrigel™, y se dejó que se adhirieran una noche. Al día siguiente, se observó que los agregados se habían adherido y las células habían migrado/proliferado desde la colonia hasta formar una monocapa. La inmunocitoquímica contra SOX2 reveló que no se había producido tampoco la recuperación de su expresión (**figura 26**).

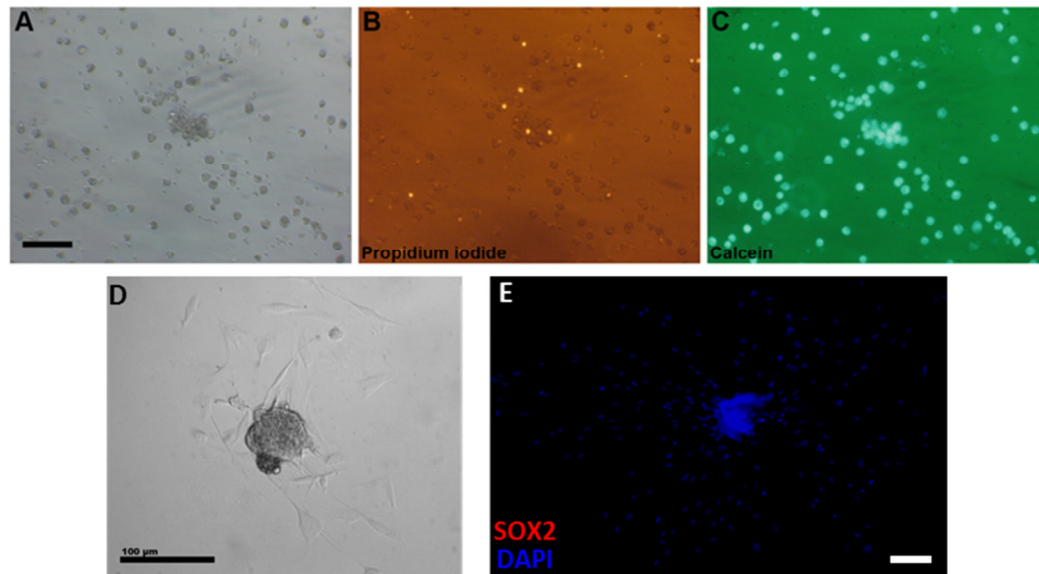


Figura 26. Resultados del ensayo de generación de cultivos flotantes a partir de células en monocapa. A. las células adherentes formaron agregados celulares en condiciones de baja adherencia, tanto tras la adición de β -mercaptoetanol (imagen de contraste de fases). Los grupos contenían en su mayoría células vivas (C, tinción con calceína), aunque también incluían células muertas (B, tinción con yoduro de propidio). La barra de escala representa 50 μ m. D. Imagen de contraste de fases donde se observa que, tras 24 en condiciones adherentes, los grupos celulares se adhieren a la superficie y comienzan a surgir células a partir de ellas. E. Inmunocitoquímica contra la proteína SOX2, que no detectó su presencia. Barra de escala = 100 μ m

3.2.3. Análisis de la expresión de marcadores de linaje neural

El análisis de expresión molecular por PCR demostró que este enriquecimiento en SOX2 también era coincidente con diferente expresión en los marcadores de linaje neural. En primer lugar, se comprobó que las células adherentes derivadas del cultivo en esfera presentaban un patrón de expresión muy similar al de las células adherentes del protocolo original: mostraban expresión de los mismo marcadores de oligodendrocito (*NG2*, *PDGFRA*, *CNP*) y también los marcadores neuronales *MAP2* Y β - *III tubulina*, aunque no se observaba la expresión de *GFAP* alfa en las nuevas células (**figura 27 y 28**) Por el contrario, las células en esfera presentaba la expresión de un mayor número de genes gliales: además de los anteriores, se podía detectar la presencia del marcador de progenitor oligodendrogial *DM20*, así como los transcritos correspondientes a los factores de transcripción necesarios para la diferenciación *OLIG1* y *OLIG2* y las proteínas de mielina *PLP*, *MAG* y *MBP* (**figura 28**). También se halló la presencia de ARNm correspondiente al gen astrogial *S100B*, ausente en el resto de muestras (**figura 23**).

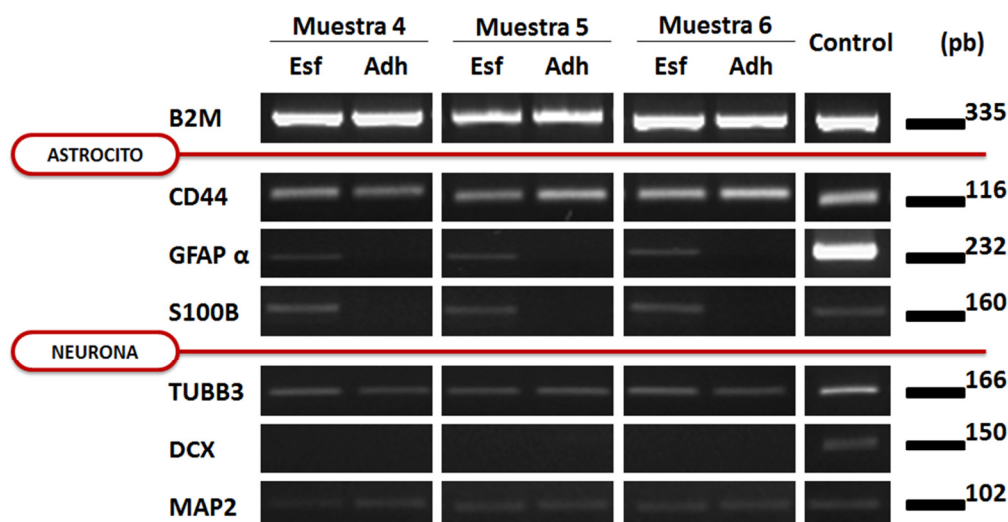


Figura 27: Análisis de expresión mediante RT-PCR de diferentes marcadores moleculares relacionados con el linaje astrogliar y neuronal para 3 cultivos de células que se expanden como esfera y sus correspondientes cultivos adherentes generados a partir de ellas. Los patrones de expresión se han analizado con referencia al gen control β 2-microglobulina.

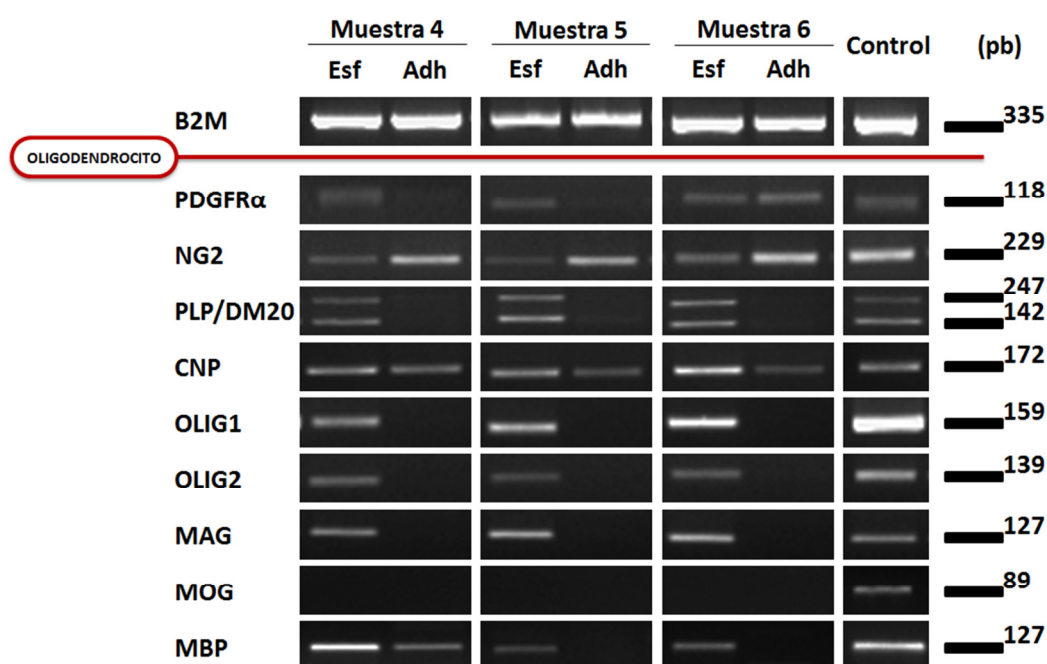


Figura 28. Análisis de expresión mediante RT-PCR de diferentes marcadores moleculares relacionados con el linaje oligodendroglial para 3 cultivos de células que se expanden como esfera y sus correspondientes cultivos adherentes generados a partir de ellas. Los patrones de expresión se han analizado con referencia al gen control β 2-microglobulina.

3.2.4. Análisis inmunofenotípico de marcadores de linaje glial

Interesados en la posibilidad de que esta población que generaba esferas contuviera progenitores de oligodendrocitos, se llevó a cabo una tinción inmunocitoquímica *in vivo* para los marcadores A2B5 y O4 en las células del cultivo inicial (**figura 29**). Se detectó la presencia de ambos marcadores únicamente en las esferas, y no en el cultivo adherente. La mayoría de las células eran A2B5⁺, lo cual parece indicar que esta población no era coincidente en su mayor parte con los progenitores de oligodendrocito A2B5⁺ previamente descritos.

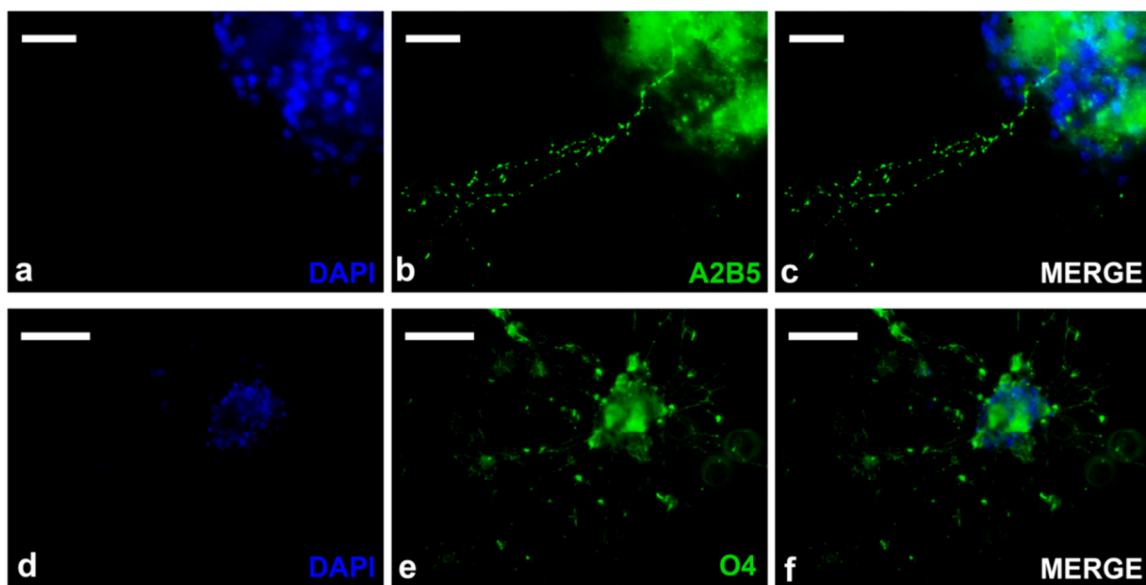


Figura 29: Inmunocitoquímica para células en esfera en su pase inicial contra los marcadores de oligodendrocito A2B5 (a-d) y O4 (e-h). Las barras de escala representan 20 μm (a-c) and 50 μm (d-f).

Para poder cuantificar su presencia, se realizó un análisis por citometría de flujo de muestras de dos pacientes recién aisladas. Solo un 0'04% resultó positivo para el marcador A2B5, siendo este valor incluso inferior al de células positivas del total de aisladas en trabajos anteriores (Roy y col., 1999) (**figura 30**).

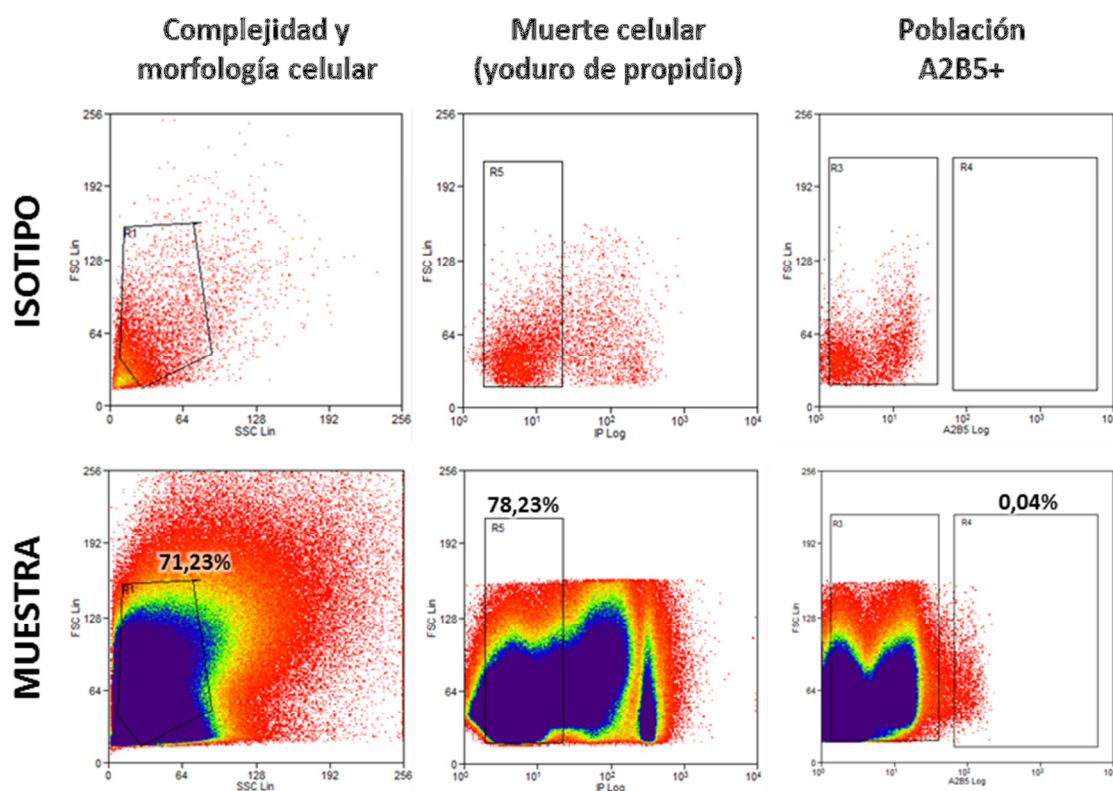


Figura 30: Análisis de la expresión de A2B5 por FACS para células aisladas por el protocolo original. El porcentaje de células vivas se ha calculado mediante cotinción con yoduro de propidio. Se muestran los histogramas correspondientes al isotipo (arriba) y la muestra de sustancia blanca (abajo). La región de interés considerada, que se correspondería con la población A2B5⁺/IP⁻, aparece delimitada en la región 4 (R4), que resultó de un 0,04%.

3.3. Diferenciación celular

3.3.1. Diferenciación espontánea de esferas.

Recientemente se ha comprobado que cultivos humanos de tipo oligodendroglial son capaces de progresar *in vitro* en su mismo medio de cultivo debido a su capacidad intrínseca de regeneración de membrana (REF). Por otro lado, la observación experimental indica que cuando las esferas se adhieren, tienden a perder su capacidad proliferativa.

Por ello, para examinar su diferenciación espontánea, se sembraron pequeñas esferas del pase 1 en cubreobjetos recubiertos con Matrigel y se mantuvieron en medio con factores de crecimiento durante 14 días. Durante ese tiempo, las esferas no crecieron o, al menos, lo hicieron más despacio que las esferas que se mantenían sin adherir, sugiriendo que, efectivamente, la adhesión estaba limitando la proliferación. Además, se observó que a partir de las colonias se emitían prolongaciones celulares de forma radial.

Cuando se llevó a cabo la inmunotinción (**figura 31**), se comprobó que la adhesión había inducido una disminución media del número de células SOX2⁺ ($45,38\% \pm 20$). Además todas las esferas contenían células positivas para el marcador de superficie O4, uno de los primeros antígenos que aparecen en células totalmente comprometidas a linaje oligodendroglial (pre-oligodendrocitos), y que se mantiene en el oligodendrocito maduro, y que marcaba la gran mayoría de prolongaciones observadas.

El recuento indicó que un $58,35 \pm 21,11\%$ era O4⁺, siendo $46,92 \pm 24,73\%$ de ellas SOX2⁺ O4⁺ ($26,72 \pm 14,25\%$ del total de células).

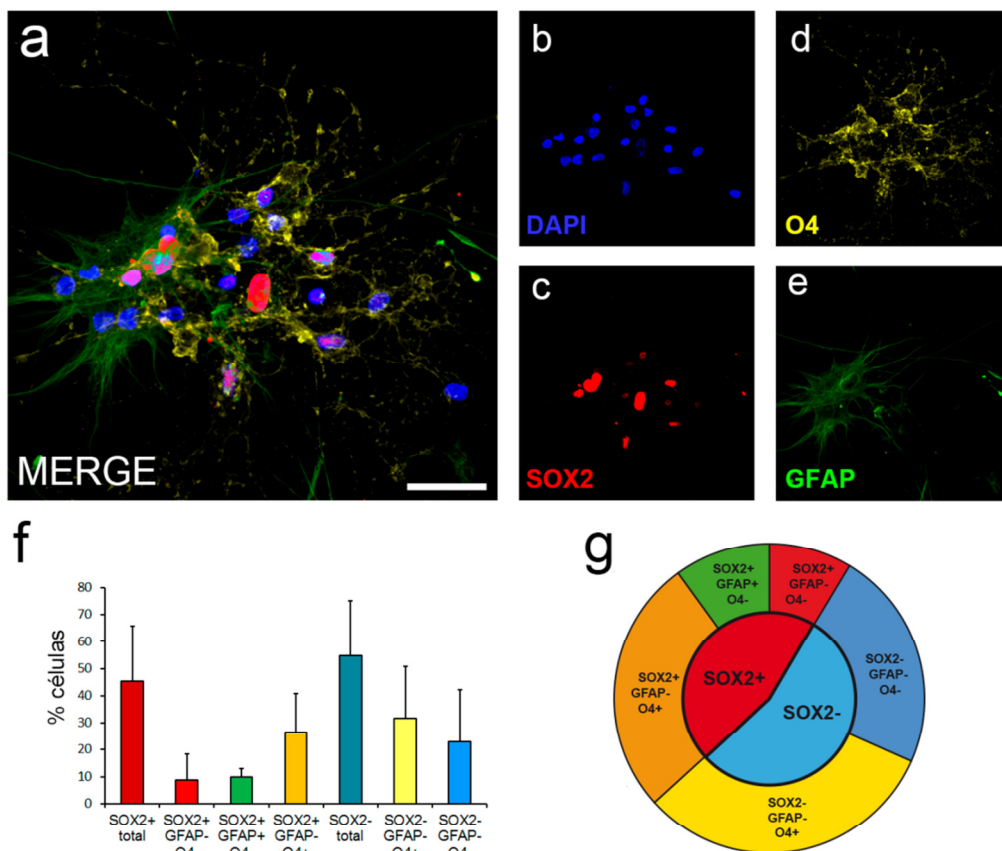


Figura 31: Resultados de la diferenciación espontánea de las células en esfera tras 14 días de adhesión. (a-e) Inmunohistoquímica contra los marcadores SOX (c), O4 (d) GFAP (e). Los núcleos están contrateñidos con DAPI (b). La barra de escala representa 25 nm. (f) Porcentajes de distribución de los marcadores dentro de las esferas. Las barras representan media \pm desviación típica. (g) Diagrama circular representa la distribución de los marcadores dentro de cada esfera, donde se puede apreciar de formas más visual el porcentaje de células O4⁺ que se obtiene tras la adhesión.

También se encontraron células GFAP⁺, que mostraban una alta inmunoreactividad a SOX2⁺. La tinción GFAP y O4 fue en todos los casos excluyente. En general, los astrocitos GFAP⁺ eran más grandes, con mayor citoplasma, mayor núcleo, y además, tendían a aparecer fuera del núcleo de la esfera. Por último, no se detectaron neuronas/ neuroblastos MAP2⁺ (figura 32).

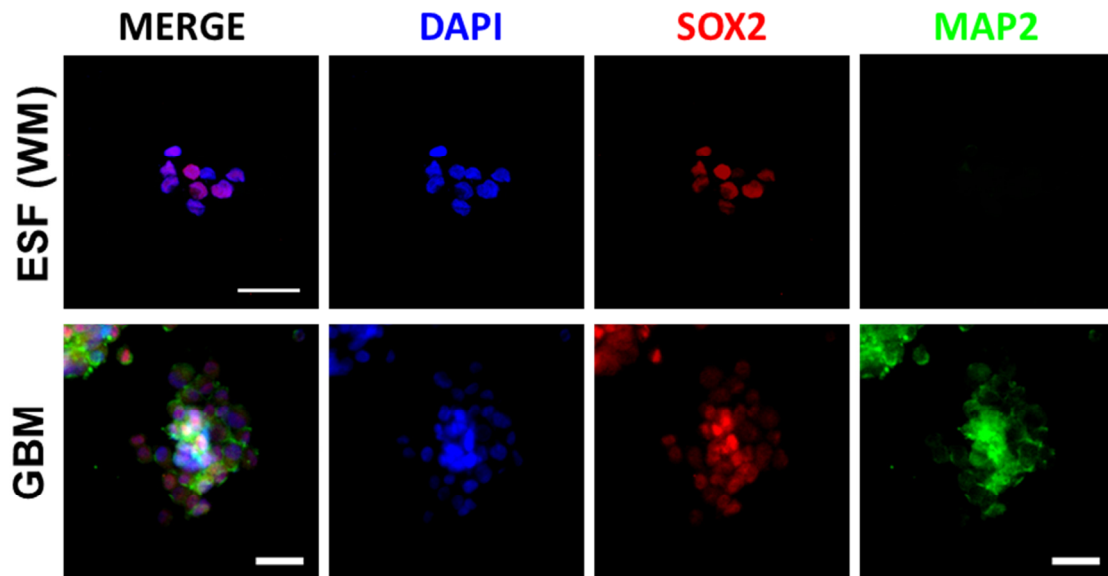


Figura 32: Inmunocitoquímica contra la proteína SOX2 y la proteína neural MAP2 para células crecidas en esfera (parte superior) tras permanecer 14 días en adhesión. La tinción resultó negativa para MAP2. Se usó como control positivo células de líneas primarias derivadas de glioblastoma. Barra de escala = 20 μ m

Por lo tanto, las células SOX2⁺ se corresponden a una subpoblación de células proliferativas con características de progenitores gliales, capaces de generar células de linaje oligodendroglial O4⁺ y, en menor medida, astrocitos GFAP⁺. Esta bipotencialidad se corresponde con la observada por otras poblaciones de progenitores de oligodendrocitos, aunque, como se discutirá luego, no está claro que su comportamiento *in vivo* e incluso *in vitro* sea el mismo.

3.3.2. Ensayo de diferenciación hacia linaje oligodendroglial

Con el fin de comprobar si las células que crecían en esfera eran capaces de producir oligodendrocitos con un fenotipo más maduro, y determinar si las células que crecen en monocapa eran capaces de adquirir un fenotipo oligodendroglial bajo estímulos epigenéticos, células de los pases tempranos de los 3 tipos de muestras fueron usadas para ensayar un protocolo de diferenciación estándar.

Las esferas de pase 1 fueron disgregadas, sembradas a una densidad de 4000 cél/cm² sobre Matrigel en un medio suplementado con bFGF, PDGF α y Neurotrofina 3, factores que se ha demostrado favorecen la proliferación y supervivencia de los progenitores de oligodendrocitos. Cuando las células alcanzaron una alta confluencia, se cambió a un medio suplementado con un 2% de suero fetal bovino y triyodotironina, para inducir una diferenciación espontánea. Las células adherentes fueron sembradas a 2000 cél/cm² sobre Matrigel con medio de proliferación hasta alcanzar una confluencia en torno al 80%, momento en el cual se cambiaba el medio por otro con los factores mencionados anteriormente, y una semana después se volvía a cambiar el medio por otro con suero al 2%.

La visualización rutinaria de los cultivos nos permitió observar que el tratamiento inducía muerte celular en todos los casos. En los cultivos en esferas las células sí sufrieron cambios morfológicos importantes, abandonando su morfología esférica y adquiriendo ramificaciones. El análisis por inmunocitoquímica reveló que en estos cultivos se habían obtenido células MBP+; estas células presentaban unas ramificaciones más definidas a partir del perinúcleo, aunque no se observaron las extensiones de membrana características que suele observarse para oligodendrocitos totalmente maduros en cultivo con esta tinción (**figura 33**).

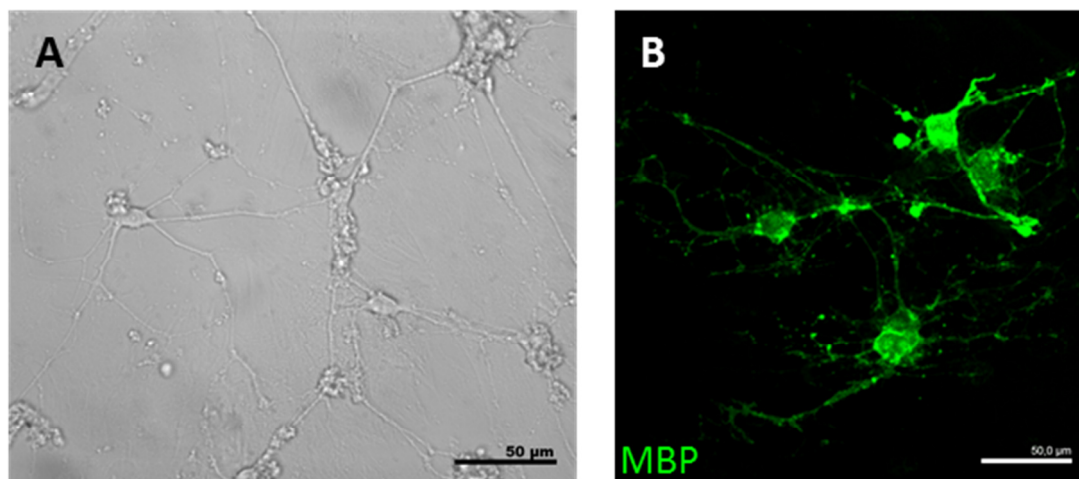


Figura 23. Resultados de la diferenciación tras estimulación con factores de crecimiento de las células en esfera. A. Cambios morfológicos observados en contraste de fases tras finalizar el experimento. B. Tinción inmunocitoquímica contra la proteína de mielina MBP.

En cambio, en el caso de los cultivos en adherencia, no se habían obtenido células O4⁺ ni A2B5⁺, ni tras el primer tratamiento con factores de crecimiento, ni tras el cultivo con suero. Por ello, para complementar el estudio y observar que ocurría con la expresión de los marcadores estudiados anteriormente, se aisló ARN de estas muestras al final del experimento.

El análisis de marcadores reveló que el tratamiento sí parece inducir una pérdida de marcadores de indiferenciación, excepto *Vimentina* y *Nestina* (**figura 34**). En cuanto a los marcadores de diferenciación, se produce una pérdida de *GFAP alfa* en las células del protocolo estándar, donde tampoco se detecta la aparición de marcadores oligodendrogiales, manteniéndose en general la expresión de *PDGFRa*, *NG2* y *CNP*. En cambio, en las células adherentes procedentes de esfera sí se detectó la aparición de *MBP* en las dos muestras analizadas (**figura 35**).

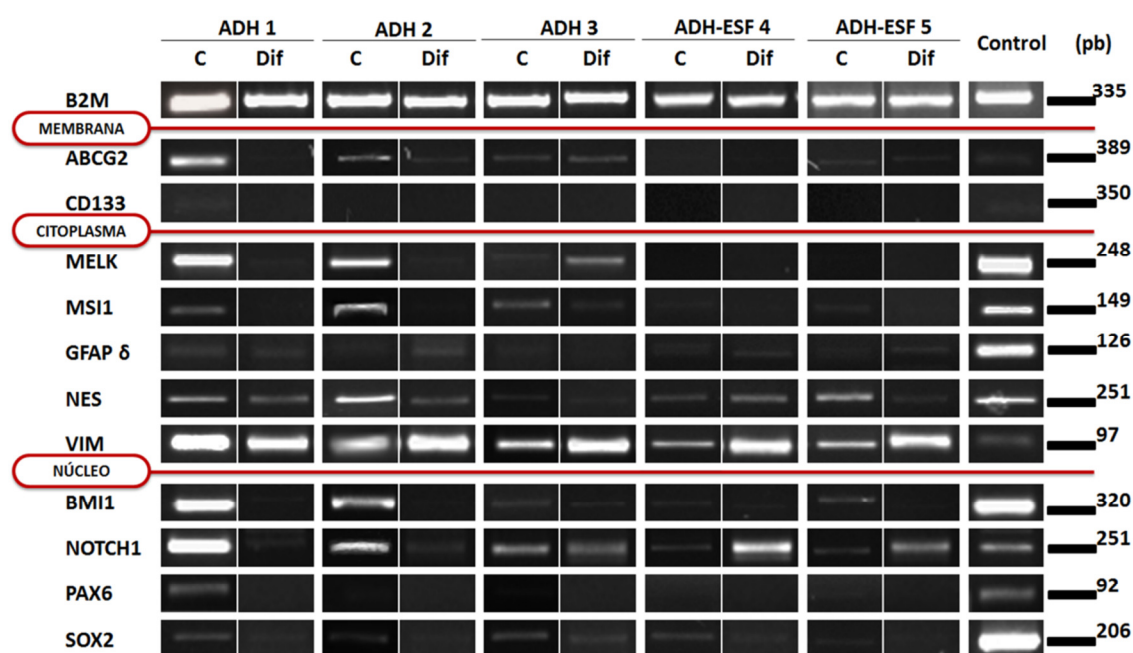


Figura 34: Análisis de expresión mediante RT-PCR de diferentes marcadores moleculares relacionados con el estado indiferenciado para 3 cultivos adherentes aislados con el protocolo estándar (ADH1, ADH2 y ADH3) y 2 cultivos adherentes generados a partir de líneas en esfera (ADH-ESF 4 y ADH-ESF 5) sometidos a un ensayo de diferenciación hacia linaje oligodendroglial mediante factores de crecimiento. Los patrones de expresión se han analizado con referencia al gen control β2-microglobulina.

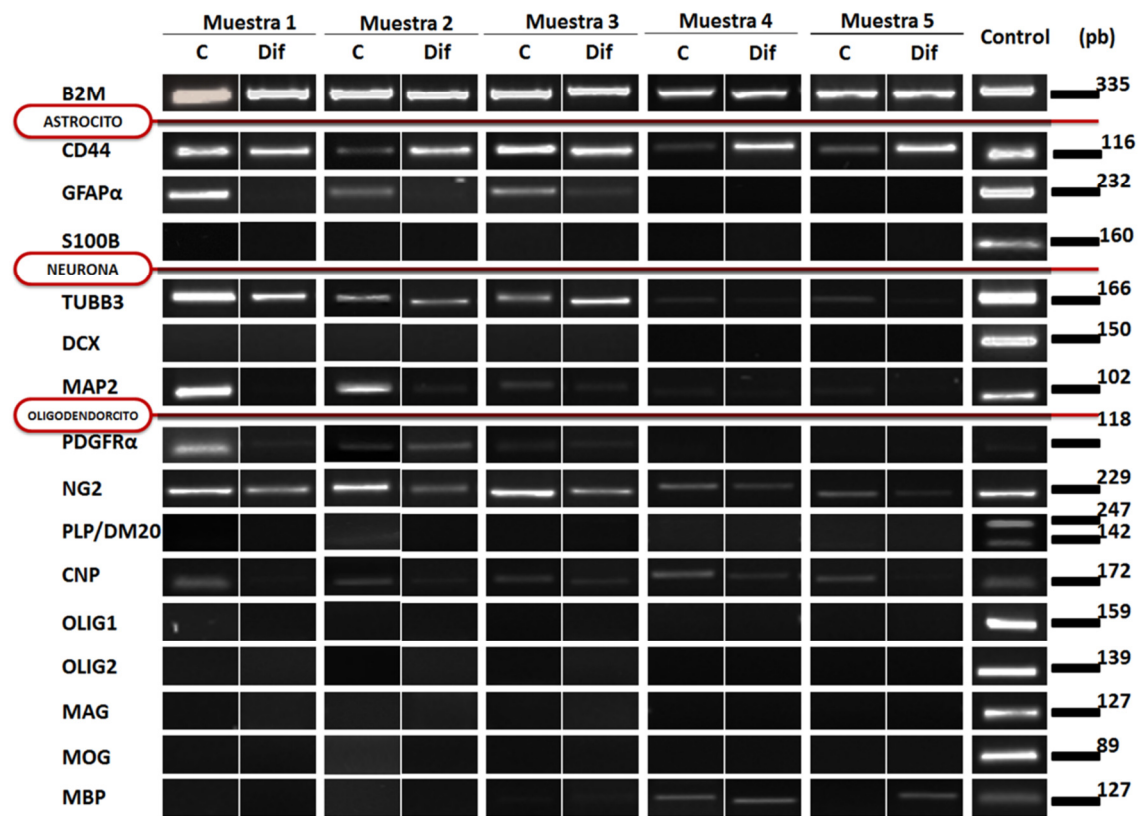


Figura 35: Análisis de expresión mediante RT-PCR de diferentes marcadores moleculares relacionados con cada uno de los 3 linajes neurales para 3 cultivos adherentes aislados con el protocolo estándar (ADH1, ADH2 y ADH3) y 2 cultivos adherentes generados a partir de líneas en esfera (ADH-ESF 4 y ADH-ESF 5) sometidos a un ensayo de diferenciación hacia linaje oligodendroglial mediante factores de crecimiento. Los patrones de expresión se han analizado con referencia al gen control β 2-microglobulina.

4. BÚSQUEDA DE CÉLULAS SOX2⁺ EN LA SUSTANCIA BLANCA HUMANA ADULTA

El descubrimiento de esta población SOX2 in vitro planteaba dos hipótesis respecto a su procedencia: o bien las células SOX2⁺ estaban presentes en el tejido cerebral humano adulto, o bien se trataba de una expresión adquirida en cultivo, inducida por el estímulo de daño generado por el proceso de extracción y/o por las condiciones de cultivo. Para responder esta cuestión, se decidió continuar el estudio tratando de detectar la presencia de células SOX2⁺ en 4 muestras de tejido original de sustancia blanca humana adulta.

4.1 Obtención de controles positivos y puesta a punto

En primer lugar se puso a punto el protocolo de tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo contra SOX2. Para ello se utilizó como control positivo muestras de glioblastoma, dado que en la bibliografía encontramos que en general, los tumores gliales expresaban SOX2, si bien la expresión varía ampliamente entre muestras. Así pues, con objeto de verificar los datos encontrados en la bibliografía y seleccionar el mejor control positivo, primero analizamos la expresión de SOX2 en una serie compuesta por un total de 54 muestras de tumores gliales, que incluían tejido fijado en PFA al 4% y ARN extraído de tejido fresco con TRIzol™, todas ellas obtenidas bajo un proyecto aprobado por el comité de ética del departamento de Neurocirugía del Hospital La Fe (Valencia). La distribución del tipo de muestras aparece recogida en la **figura 36**.

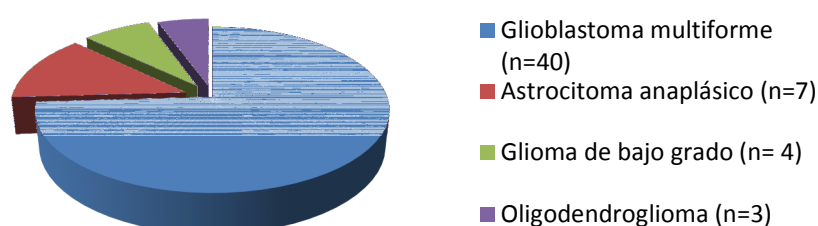


Figura 36: Distribución de los tipos de tumor en la serie de muestras disponibles para usar como control positivo

Se llevó a cabo un muestreo de la expresión de SOX2 mediante PCR a tiempo real en toda la colección. Se calculó la expresión relativa del gen *SOX2* mediante PCR a tiempo real normalizándolo de acuerdo a los niveles de expresión de 3 genes de mantenimiento (*B2M*, *GAPDH* y *ACTB*). Tal y como se había descrito previamente,

la expresión era variable entre las muestras, y no observamos ningún patrón entre los distintos tipos de muestras (Alonso y col., 2011; Annovazzi y col., 2011) (**figura 37**).

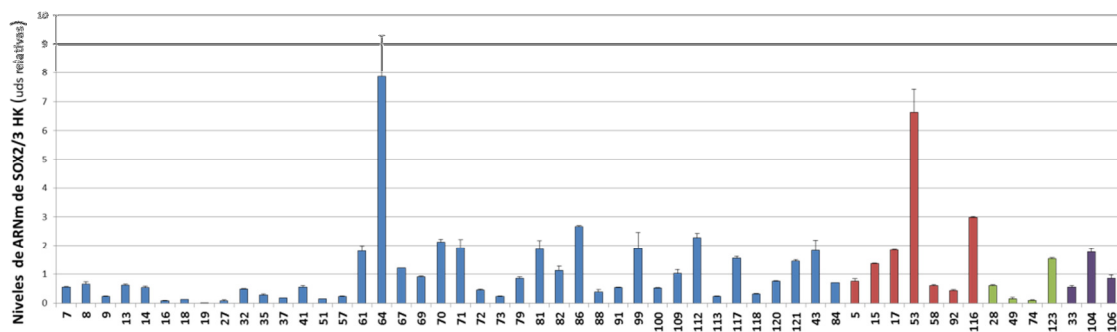


Figura 37. Valores relativos de ARNm del gen *SOX2* normalizados a la cantidad de transcritos de 3 genes de mantenimiento (HK) para la serie de tumores considerada (glioblastomas (azul), astrocitomas anaplásicos (rojo), gliomas de bajo grado (verde), oligodendrogliomas (morado)). Las barras de la gráfica representan la medias \pm desviación típica correspondiente a dos mediciones independientes.

De entre aquellas muestras de las que se disponía suficiente tejido para poder usar de forma rutinaria como control positivo, se escogieron dos que presentaban una expresión alta de SOX2 en relación al resto. También se seleccionaron dos muestras con una expresión baja, con el fin de comprobar si la cantidad relativa se podía correlacionar con la expresión de proteína final. Se realizaron cortes de 12 μ m en el criostato con el fin de evitar la pérdida de antigenicidad que puede producir otros métodos alternativos como la inclusión en parafina. Para la tinción inmunohistoquímica, se empleó el mismo anticuerpo que el usado en la inmunocitoquímica, y en la misma concentración. Se requirió de un tratamiento de desenmascaramiento de antígeno mediante tampón citrato hirviendo durante 1 h. De este modo, se comprobó que aquellas muestras que presentaban una mayor expresión de SOX2 a nivel de ARNm se correspondían con las que presentaban un mayor número de células SOX2⁺. La tinción aparecía restringida al núcleo, excepto en el caso de células en división, en las cuales se detectaba de forma difusa en el citoplasma (**figura 38**). También se comprobó que las muestras excesivamente fijadas (más de 72 horas) no podían ser teñidas, dato a tener en cuenta para las sucesivas fijaciones de muestras.

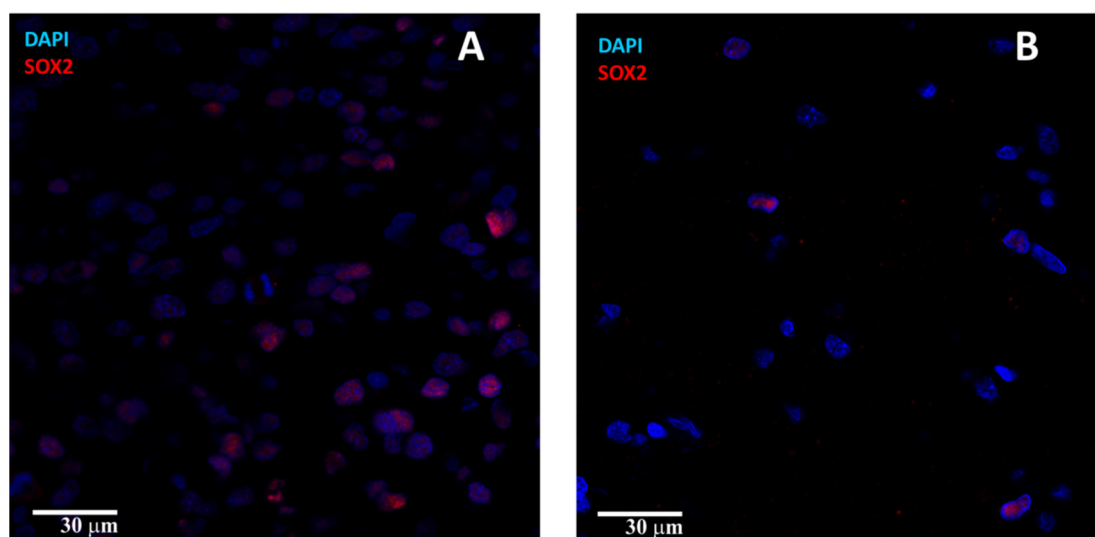


Figura 38. Inmunotinción contra la proteína SOX2 para una muestra de glioblastoma con un nivel de expresión de ARNm SOX2 alto (A) y otra con un nivel bajo (B). Se comprobó que el número de células SOX2⁺ era mayor en aquellas células con mayores niveles de ARNm para SOX2.

Una de las muestras fue escogida como control positivo, y empleada para todas las tinciones y cotinciones realizadas en nuestro tejido problema (**figura 39**).

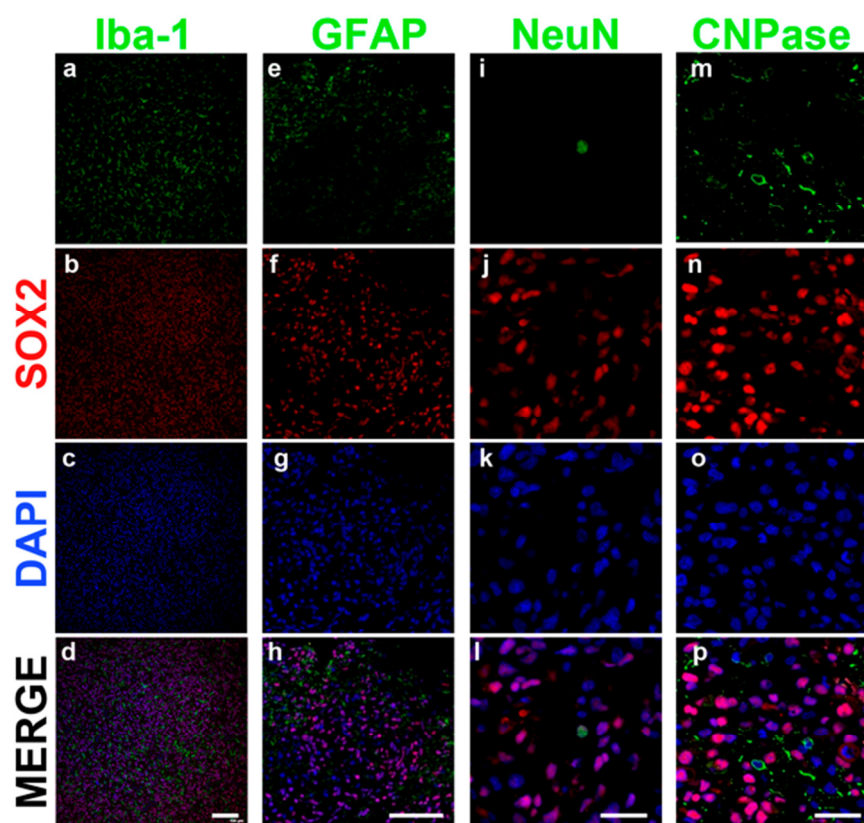


Figura 39: Secciones de una muestra de glioblastoma multiforme que expresaba altos niveles de SOX2 fueron utilizadas como control positivo. El panel muestra inmunotinciones dobles contra SOX2 (rojo) combinado con IBA1 (a-d), CNP (e-h), NeuN (i-l) y GFAP (m-o). Las barras de escala representan 100µm (d, h) o 350 µm (l, p).

4.2. Inmunohistoquímica contra la proteína SOX2

Tras la puesta a punto sobre tejido tumoral, se pasó a realizar la tinción para el marcador SOX2 sobre los cortes de 12 μm de muestras de sustancia blanca de lóbulo temporal, realizados también con criostato.

Durante las primeras pruebas, se observó que era prácticamente imposible diferenciar marca específica debido a la gran autofluorescencia que presentaba el tejido, por lo cual se decidió probar 3 tratamientos para reducirla en cortes de una de las muestras.

1. Tratamiento con borohidruro: está especialmente indicado para eliminar la autofluorescencia generada por las bases reversibles de Schiff formadas por los fijadores de tipo aldehído.
2. Tratamiento con una solución de glicina, que se une a los grupos libres de los aldehídos evitando que emitan la fluorescencia.
3. Tratamiento con Negro Sudán. Se trata de un colorante lipofílico que ha sido utilizado en inmunofluorescencia de tejido cerebral, debido a la presencia de un resto de la degradación de la hemoglobina, la lipofucsina. Se sumerge el corte durante 10 minutos en una solución al 1% de negro sudán en etanol y posteriormente se elimina la cantidad sobrante mediante lavados.

Tras llevar a cabo los tres protocolos en paralelo, se determinó que el tratamiento más efectivo para la reducción de la autofluorescencia era el negro sudán, por lo que se incluyó en todos los experimentos posteriores.

La inmunotinción reveló la presencia de células SOX2⁺ en todas las muestras analizadas. Éstas aparecían raramente dispersas a lo largo de la sustancia blanca, aunque a veces aparecían concentradas en pequeñas áreas. El número de células SOX2⁺ era de $2,01 \pm 0,73\%$ del total de células. La intensidad de la tinción era mucho más tenue de lo observado en las muestras de glioblastoma, lo que podría corresponderse con una menor expresión del marcador. También por este motivo los recuentos tienen un valor aproximado, y tampoco se ha profundizado más en el recuento de colocalización: dado que la intensidad es baja, es necesario captar la fluorescencia de varios planos, lo que hace que sea imposible dar valores de secciones al no saber el grosor ni la cantidad de células pertenecientes al mismo plano que estamos observando en la fotografía.

4.3. Coinmunotinción con marcadores de los diferentes linajes neurales.

Para poder conocer un poco más acerca del inmunofenotipo de las células SOX2⁺, se llevaron a cabo tinciones contra SOX2 junto a marcadores de células diferenciadas presentes en el parénquima cerebral adulto.

En primer lugar, no se detectó colocalización con la proteína IBA1, una proteína de unión a calcio específicamente expresada en microglía/macrófagos, descartando una identidad microglial de las células SOX2⁺ (**figura 40**).

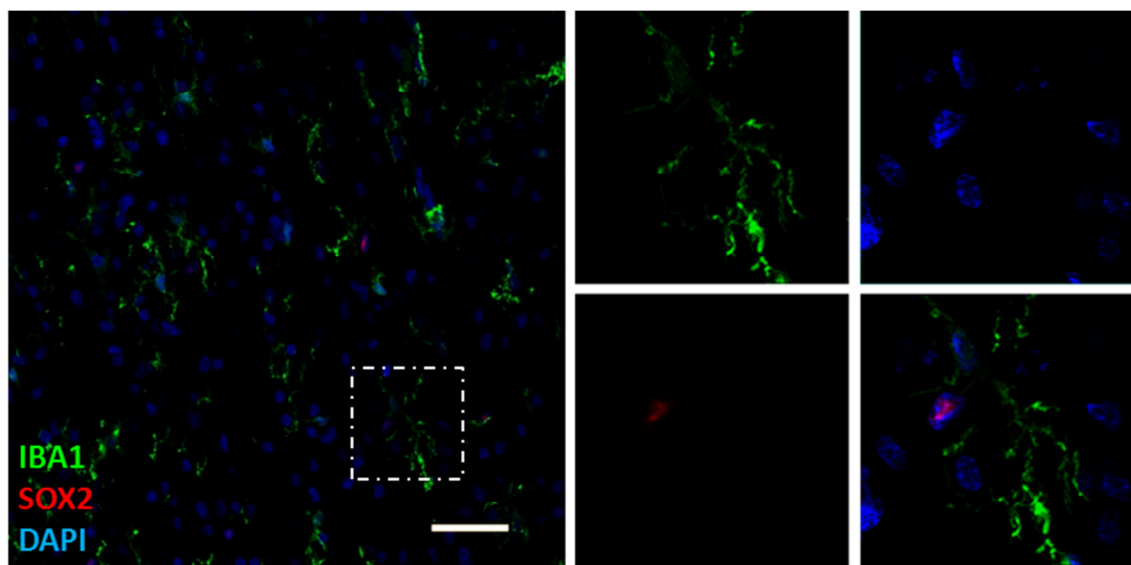


Figura 40: Inmunotinción para una sección de sustancia blanca humana adulta contra las proteínas SOX2 e IBA1. Las imágenes de la derecha representan una ampliación mostrando células SOX2⁺, siempre IBA1⁻. Barra de escala: 50 μ m.

De forma similar, tampoco se detectó la presencia de CNP (**figura 41**) ni NeuN (**figura 42**), apoyando la idea que la población SOX2⁺ no se correspondía con una población diferenciada de naturaleza oligodendroglial o astrogliar, respectivamente.

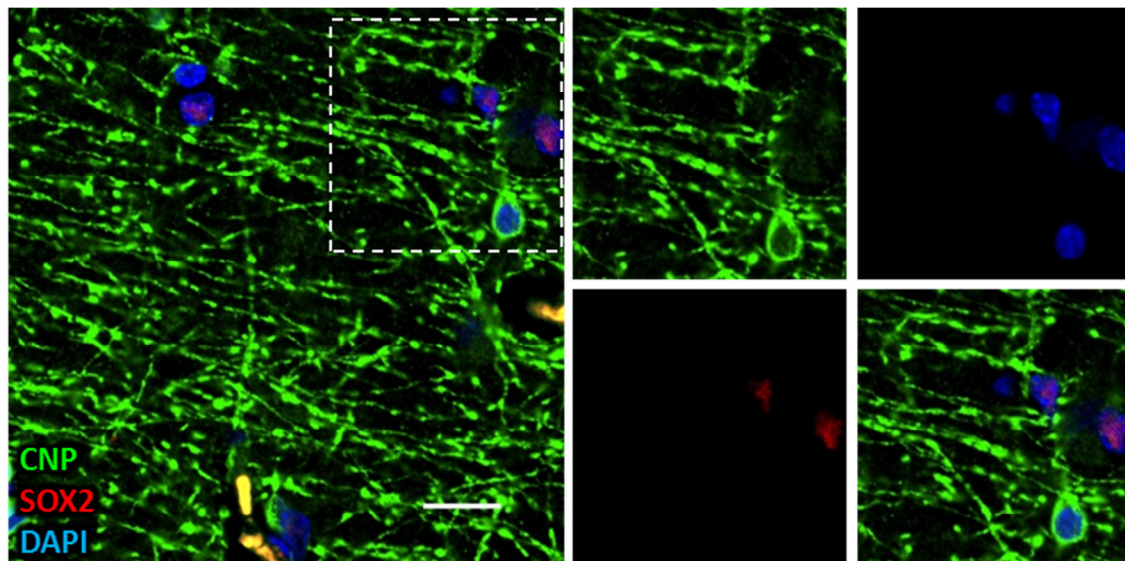


Figura 41: Inmunotinción para una sección de sustancia blanca humana adulta contra la proteína SOX2 y el marcador CNP. Las imágenes de la derecha representan una ampliación mostrando células SOX2⁺, que nunca colocalizaban con NeuN. Barra de escala: 20 μ m.

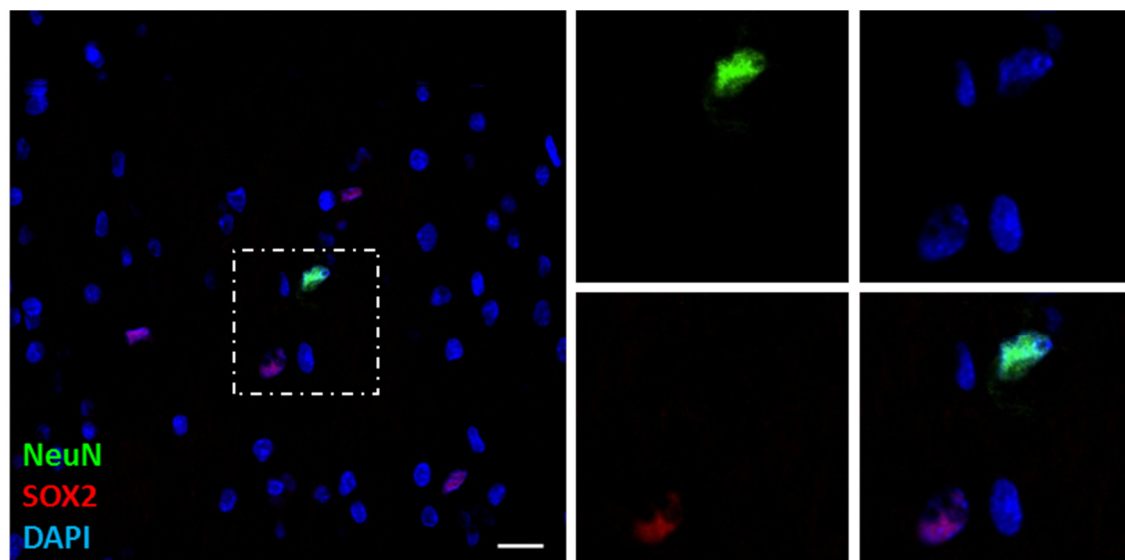


Figura 42: Inmunotinción para una sección de sustancia blanca humana adulta contra las proteínas SOX2 y el marcador neuronal NeuN. Las imágenes de la derecha representan una ampliación mostrando células SOX2⁺, que no colocalizan con CNP. Barra de escala: 50 μ m.

Sin embargo, la tinción conjunta para los marcadores GFAP y SOX2 reveló que había colocalización en una pequeña proporción de las células. Aunque es ciertamente difícil dar una estimación del número de células GFAP⁺ SOX2⁺ dada la alta inmunoreactividad de la sustancia blanca para el marcador astrogial, el número de células GFAP⁺ SOX2⁺ era siempre mayor que el de células GFAP⁺SOX2⁺, y la presencia de ambas poblaciones fue detectada en todas las muestras. En general, los astrocitos GFAP⁺SOX2⁺ tenían una morfología con mayor número de extensiones

ramificadas surgiendo del perinucleo, a diferencia de la gran mayoría de astrocitos fibrosos observados en el parénquima de la sustancia blanca (**figura 43**).

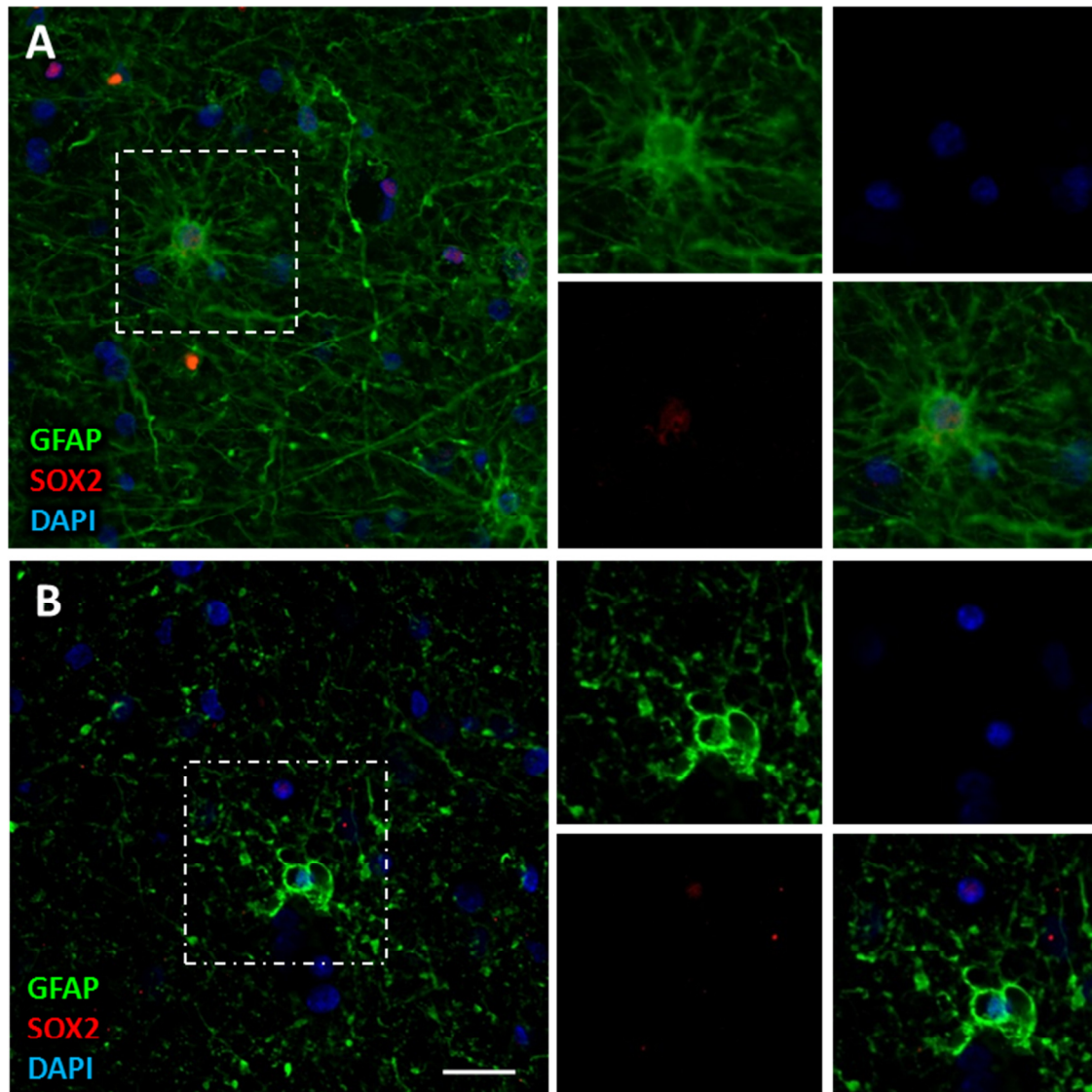


Figura 43: Inmunotinción para dos secciones de sustancia blanca humana adulta contra las proteínas SOX2 y GFAP. Las imágenes de la derecha representan una ampliación mostrando células SOX2⁺, donde se observa que hay células SOX2⁺ GFAP⁺ (A) y SOX2⁺ GFAP⁻ (B). Barra de escala: 50 μ m.

Por último, debido a la naturaleza de progenitor glial que se observaba de las células SOX2⁺ *in vitro*, se llevó a cabo una doble tinción junto con el marcador OLIG2 (**figura 44**). Dicho marcador es un factor de transcripción necesario para la diferenciación a oligodendrocito (y también algunas neuronas motoras), que se comienza a expresar temprano en el proceso de diferenciación y cuya expresión se mantiene en el oligodendrocito maduro, aunque en menor nivel. La tinción de OLIG2 mostró que, tal como se ha descrito, la gran mayoría de las células de la sustancia blanca eran positivas, aunque se observaban dos niveles de marcaje: una tinción más

leve (que según la bibliografía se corresponden con oligodendrocitos maduros) y otras marcadas más intensamente, que corresponderían a progenitores gliales (Kuhlmann y col., 2008; Rhee y col., 2009). Las imágenes de microscopía confocal revelaron que la mayor parte de las células OLIG2⁺ teñidas intensamente eran SOX2⁺, aunque también se hallaban células OLIG2⁺alto SOX2⁻, y también células SOX2⁺ OLIG2⁺bajo y células OLIG2⁻ SOX2⁺.

La población OLIG2⁺ SOX2⁺ (y CNP⁻, por inferencia) resulta especialmente relevante, puesto que la coexpresión de ambos marcadores apunta a que estas células podrían representar una población de linaje oligodendroglial indiferenciada, haciéndola más parecida al fenotipo celular observado *in vitro*.

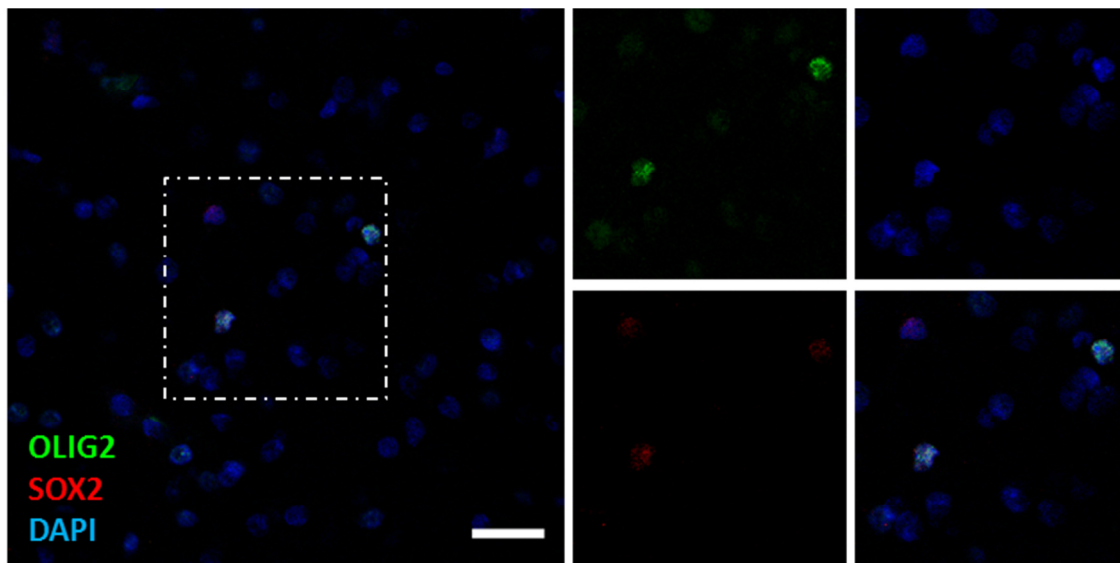


Figura 44: Inmunotinción para dos secciones de sustancia blanca humana adulta contra las proteínas SOX2 y OLIG2. Las imágenes de la derecha representan una ampliación mostrando, por un lado, que hay células con alta expresión de OLIG2 y células con baja expresión del mismo; por otros, se observa que hay células SOX2⁺OLIG2⁺(ALTO), aunque también células SOX2⁺OLIG2⁺(BAJO), y, aunque no aparecen en la fotografía, también se detectaron células SOX2⁺OLIG2⁻. Barra de escala: 25 μ m.

DISCUSIÓN

Las enfermedades desmielinizantes son patologías de tipo autoimmune que cursan con la lesión del complejo oligodendrocito-mielina. Además de la necesidad de terapias eficaces que ayuden a detener o ralentizar la enfermedad, de las que se carece hoy en día, también se hace fundamental un estudio acerca de las posibilidades de recambio de las células dañadas. De entre los múltiples tipos celulares candidatos propuestos en la bibliografía para ser utilizados en técnicas de terapia regenerativa, resultan especialmente relevantes los progenitores de oligodendrocitos. Estas células están presentes en la sustancia blanca del propio paciente, lo que permitiría una movilización endógena, evitando así una expansión *in vitro* o la introducción heteróloga de células. Por ello, en este trabajo se ha abordado una caracterización de las células proliferantes que se pueden obtener a partir de muestras de sustancia blanca de pacientes vivos, así como una búsqueda de nuevas subpoblaciones celulares y una mejora del protocolo de aislamiento.

Durante la primera parte de este proyecto, se abordó el aislamiento de células progenitoras siguiendo el protocolo estándar descrito previamente (Roy y col., 2000; Nunes y col., 2003; Ayuso-Sacido y col., 2008). Mediante esta técnica, fuimos capaces de aislar células mitóticamente competentes, de morfología bipolar/fibroblástica, que se expandían en forma de monocapa y podían ser subcultivadas un número determinado de pases, similares a poblaciones anteriormente extraídas y caracterizadas del parénquima cerebral humano adulto (Ayuso-Sacido y col., 2008).

El número de células que se puede obtener a partir de las muestras es un factor limitante, tanto para su uso experimental y pruebas farmacológicas, como para su posible utilización en futuras terapias de medicina regenerativa. Por ello, nos planteamos averiguar durante cuántos pases podían mantenerse estas células en cultivo, además de comprobar si su identidad iba evolucionando a lo largo de los pases.

Observamos que esta población celular no puede expandirse durante un número elevados de pases, sufriendo un arresto de la proliferación al alcanzar los pases 7/10. Los recuentos de células Ki67⁺ mostraron un descenso en el porcentaje de células en fase activa del ciclo celular, en la misma línea que los estudios previamente realizados con el marcador de proliferación BrdU (Walton y col., 2006). También comprobamos que esta parada se producía por una entrada en quiescencia. En general, la interrupción de la proliferación en cultivo se asocia a la senescencia, mientras que la quiescencia es mimetizada artificialmente mediante la retirada de factores de crecimiento o suero del medio (Blagosklonny, 2011; Blagosklonny, 2012).

No obstante, lo cierto es que la quiescencia es el estado natural de la mayoría de las células adultas diferenciadas en su nicho natural, que dejan de responder a señales de proliferación/diferenciación de acuerdo a un programa intrínseco.

En cualquier caso, la hipertrofia celular es considerada uno de los marcadores asociados a la pérdida del potencial proliferativo (Blagosklonny, 2011). A diferencia de anteriores trabajos (Walton y col., 2006), nuestro estudio morfológico por microscopía electrónica reveló alteraciones celulares al comparar pases tempranos y pases tardíos: aparición de invaginaciones nucleares, incremento de fibras de estrés y acúmulo de vesículas en paralelo con a la pérdida de la capacidad de división.

Además, se comprobó que en una de las muestras, al llegar a pase 10, aproximadamente un 40% de la población presentaba una duplicación del cromosoma 10, coincidiendo con la entrada en quiescencia. Se trata de una parte del estudio muy limitada, puesto que sólo se ha realizado en unas de las muestras, y el análisis por CGH sólo permite detectar alteraciones pequeñas en el número de copias de ADN, pero no alteraciones de tipo estructural, como translocaciones pequeñas o inversiones; sin embargo, viene a complementar los resultados del cariotipo publicados anteriormente (Walton y col., 2006), mostrando que las células permanecen genéticamente estables hasta la parada de proliferación.

Para tratar de definir la identidad molecular de estas células, se llevó a cabo un análisis de la expresión de marcadores por PCR. Esta técnica presenta una serie de ventajas e inconvenientes: por un lado, permite estudiar un gran número de marcadores con un pequeño número de células, lo cual resulta especialmente interesante en caracterizaciones iniciales de poblaciones heterogéneas. Por contra, no resulta válida para estudiar la coexpresión de estos marcadores a nivel celular, y, como hemos podido comprobar, la expresión de ARNm no siempre se correlaciona con la producción final de la proteína. Al margen de estas limitaciones, encontramos que las células presentaban la expresión de marcadores descritos previamente en células madre neurales, tanto de origen fetal como adultas, tales como *BMI1*, *SOX2*, *Nestina*, *Vimentina*, *NOTCH1* o *ABCG2*. Varios de estos marcadores dejaban de detectarse o presentaban niveles descendentes en los pases finales de cultivo, siendo más o menos acentuada esta pérdida según la muestra analizada. La pérdida de expresión de marcadores de indiferenciación, junto con la capacidad multipotente, a lo largo de los pases en cultivo, se ha descrito previamente en células procedentes de cerebro fetal (Tamaki y col., 2002) y *post mortem* (Palmer y col., 2001; Schwartz y col., 2003). En este sentido, las pequeñas diferencias observadas entre las muestras analizadas podrían deberse tanto a que la muestra de origen fuera diferente (tanto porque procedan de una localización ligeramente diferente como de la variabilidad

entre pacientes) como a la selección y evolución y en cultivo, que puede resultar un proceso estocástico.

El estudio de la expresión de marcadores de diferenciación tampoco reveló una correspondencia clara con un linaje neural determinado. Lo cierto es que se detectó la presencia de ARNm de varios linajes neurales, que no parecían sufrir cambios a lo largo de los pases. La existencia de heterogeneidad es frecuente en poblaciones aisladas de tejido nervioso fetal y adulto (Imura y col., 2003; Molofsky y col., 2003; Schwartz y col., 2003). A nivel inmunofenotípico, en cambio, la característica que define esta población celular es la expresión del marcador de indiferenciación, vimentina, que se mantuvo a lo largo de los sucesivos subcultivos.

Por lo tanto, la población que habíamos conseguido purificar de acuerdo al procedimiento habitual presentaba una capacidad proliferativa limitada. Podía ser expandida hasta alcanza un estado de quiescencia, pero sin llegar a alcanzar una perfil diferenciado de ninguna línea neural, quedando pues atrapada en un estado de indiferenciación. Finalmente, cuando más adelante las células fueron sometidas a un protocolo de diferenciación espontánea que, de acuerdo a la bibliografía, promueve la diferenciación oligodendroglial, no se detectaron cambios en la expresión de genes de la línea de maduración de oligodendrocito, ni tampoco la aparición de marcadores tempranos como A2B5. Este conjunto de evidencias indica que su potencial para generar células maduras, al menos según nuestras condiciones de cultivo, parece estar limitado.

Con estos resultados, nos planteamos introducir modificaciones en el protocolo de aislamiento, con el doble objetivo de mejorar el rendimiento en la obtención de cultivos viables, a partir de muestras de sustancia blanca de cerebro humano adulto, y de intentar ampliar nuestros conocimientos sobre la diversidad de tipos celulares, dentro de la población de progenitores de oligodendrocitos, con diferentes potencialidades en cuanto a su posible utilización en futuras terapias de regeneración de axones desmielinizados.

Para lograr estos objetivos, se incluyó un paso final en el protocolo que consistía en una centrifugación en una solución de sacarosa, descrito como un método para eliminar los restos de mielina generados tras la disgregación de la sustancia blanca (Johansson y col., 1999), que resultan tóxicos para las células en cultivo. Los resultados muestran que la inclusión de este paso ha transformado el protocolo estándar en un sistema de purificación de una subpoblación muy definida y desconocida hasta el momento en cerebro humano adulto. Esta selección muy posiblemente se deba a diferencias en la densidad celular de la población

heterogénea inicial. Este método, usado frecuentemente en el aislamiento de células madre neurales (Maric y col., 1998; Palmer y col., 1999; Chen y col., 2007a), consiste en la generación de un gradiente de densidad mediante un disolvente, que, mediante centrifugación, permite separar fracciones celulares en función de su densidad particular. De entre todos los posibles solvente, el Percoll ha sido el más empleado, generalmente en una concentración del 30%, aunque su aplicación ha quedado restringida a la investigación tras el descubrimiento de lotes que contenían endotoxinas.

La inclusión de una centrifugación con Percoll ha permitido el aislamiento de progenitores gliales de muestras humanas y de ratón (Ruffini y col., 2004), así como de células SOX2⁺ a partir de la ZSV de ratas adultas (Chen y col., 2007a), con características semejantes a la subpoblación de células SOX2⁺ descritas en el presente trabajo, aisladas a partir de cerebro humano adulto. Con la llegada de las tecnologías *FACS* y *MACS*, el resto de métodos ha caído bastante en desuso, puesto que ambas permiten la obtención de cultivos celulares con mayor grado de pureza, así como una selección efectiva de acuerdo a marcadores concretos (Nunes y col., 2003; Sim y col., 2011). Pese a todo, nuestra metodología también tiene una serie de beneficios importantes. En primer lugar, se trata de una técnica rápida, sencilla y barata, pues no requiere de reactivos ni equipamientos especiales. Además, nos ha permitido el enriquecimiento de una población caracterizada por un marcador nuclear, SOX2, que hubiera requerido la introducción de construcciones genómicas para su aislamiento por *FACS* (Wang y col., 2010a), una forma mucho más agresiva y poco conveniente cuando el número de células obtenidas es tan limitado (Nunes y col., 2003).

Con todo, la cuestión más relevante del presente trabajo es que hemos sido capaces de aislar e identificar, por primera vez, una población celular SOX2⁺ de cerebro humano adulto. Este hecho permite, a diferencia otras poblaciones aisladas de cerebro – caracterizadas por la expresión de A2B5 o proteínas de citoesqueleto como nestina o vimentina- poder darle una implicación funcional clara, dado el papel clave de este factor de transcripción en el mantenimiento del fenotipo de célula madre neural y control de su proliferación y posterior diferenciación (Ellis y col., 2004). Se ha comprobado que los ratones adultos cuya única copia del gen está mutada muestran una importante reducción en el número de células madre en los nichos neurogénicos (Ferri y col., 2004), aunque gracias a que existe cierta redundancia de función con otros miembros de la familia SOXB pueden mantener viables parte de estas células. En la misma línea, en nuestros estudios comprobamos que sólo las células SOX2⁺

eran capaces de generar *in vitro* agregados flotantes de tipo neurosfera, un sistema de cultivo que ha sido comúnmente asociado con las células madre neurales. Igualmente, se ha probado que la expresión de SOX2 es necesaria para la formación de neurosféricas a partir de médula espinal humana adulta (Mothe y col., 2011), zona ventricular fetal humana (Wang y col., 2010a) y diferentes zonas de cerebro de animales de experimentación (Ellis y col., 2004; Brazel y col., 2005). Además, la inducción de SOX2 es suficiente para transformar astrocitos humanos en células madre neurales que forman colonias de tipo neurosfera (Corti y col., 2012).

A lo largo de este trabajo aparece como tema transversal una comparación entre los cultivos en monocapa y los cultivos en neurosfera. Se trata de una cuestión que ha sido ampliamente discutida en la bibliografía y que aún genera controversia. El ensayo de neurosféricas ha sido desde su descripción (Reynolds y col., 1992; Reynolds y Weiss, 1992) el método más empleado para demostrar la presencia de células madre neurales en cultivo -y de hecho, continúa siendo utilizado, aunque con modificaciones (Rietze y Reynolds, 2006). Sin embargo, su uso también plantea una serie de inconvenientes: representan una población heterogénea, con células en diferentes estadios de diferenciación, células necróticas y apoptóticas (Lobo y col., 2003) por falta de penetración de nutrientes y factores de crecimiento (Svendsen et al., 1997b), y , quizás más importante, las últimas revisiones del ensayo de neurosféricas abandonan la idea de que cada neurosfera se origine a partir de una única célula (Rietze y Reynolds, 2006), debido a que se trata de estructuras altamente motiles, y la captura de una célula flotante no es un evento extraño. Esto ha hecho que algunos autores hayan defendido los cultivos en monocapa, ya que se ha comprobado que también son un mecanismo de expansión de células madre, obviando parte de estos problemas, además de presentar ciertas ventajas técnicas como permitir el seguimiento a nivel de una única célula (Babu y col., 2007). En nuestro caso, lo que observamos es que las células que generan esferas son las únicas en expresar SOX2, y por lo tanto, parecen mantener un fenotipo más indiferenciado. Además, estas células son capaces de generar un cultivo adherente, con algunas características similares con la población de monocapa obtenida del protocolo estándar: la morfología, la expresión de marcadores de diferenciación, así como la incapacidad para generar oligodendrocitos tras la estimulación con factores de crecimiento. Nuestra hipótesis es, pues, que las células en esfera SOX2⁺ representarían un estado más indiferenciado. Estas células darían lugar a otras más diferenciadas con alta capacidad proliferativa, que se expanden como monocapa y expresan vimentina. A favor de esta explicación también encontramos los estudios

realizados con la línea celular humana U87, donde se ha observado que a través de la expresión del microARN miR-378 se consigue suprimir la expresión de vimentina, lo que a su vez provoca un aumento de la expresión de SOX2, y, finalmente, un aumento de las propiedades de células madre (Deng y col., 2012). Una alternativa menos probable es que la población de esferas y la primera población aislada deriven de dos subpoblaciones diferentes presentes en el tejido original. En cualquier caso, hemos comprobado que la adhesión de los cultivos flotantes conduce a una reducción del número de células SOX2; de hecho, la gran mayoría de protocolos de diferenciación incluyen un paso de adhesión de las neuroesferas como paso previo para la diferenciación terminal. Además, en nuestras manos las células en monocapa no volvían a generar cultivos flotantes ni recuperaban la expresión de SOX2, al menos mediante el sembrado en placas de baja adherencia y adición de un agente reductor del contacto celular, el β -mercaptoetanol (Kukekov y col., 1997). En trabajos anteriores, intentos por generar neuroesferas a partir de cultivos en monocapa similares también resultaron fallidos (Walton y col., 2006).

Sin embargo, los cultivos en esfera no son exclusivos del fenotipo de célula madre, puesto que los progenitores de oligodendrocito también pueden ser expandidos como agregados celulares flotantes denominados oligosferas (Avellana-Adalid y col., 1996; Chen y col., 2007a). Cuando estudiamos la expresión de genes de los tres linajes neurales, encontramos que la expresión de SOX2 iba acompañada de una mayor expresión de genes oligodendrogiales, especialmente marcadores tempranos (*PDGFR α* , *NG2*, *DM20*, *OLIG1*, *OLIG2*), y que contenía células O4⁺ y A2B5⁺, aunque no suponían más que una pequeña parte de la población. Esta asociación entre células SOX2⁺ y genes gliales también ha sido hallada en tejido fetal (Wang y col., 2010a), y, en la ZSV, la expresión de SOX2 ha sido relacionada con un destino glial (Baer y col., 2007).

Cuando las esferas se sembraron en condiciones adherentes y se mantuvieron durante dos semanas, se observó que las esferas dejaban de proliferar o lo hacían más lentamente. En primer lugar, la inmunotinción reveló que había un menor número de células SOX2⁺. Se sabe que la pérdida de expresión de SOX2 resulta necesaria para la diferenciación terminal hacia oligodendrocito: la inhibición de la histona desacetilasa de clase I (HDAC), encargada de reducir la expresión de SOX2, conlleva un bloqueo de la diferenciación oligodendrogial en los CPOs humanos adultos, tanto a nivel de maduración morfológica como de la expresión de genes de mielina (Conway y col., 2012).

La inmunotinción también permitió detectar dos tipos de células gliales - astrocitos (GFAP⁺) y oligodendrocitos (O4⁺). Las esferas contenían ambos tipos de células, a diferencia de lo observado para las neuroesferas SOX2 de ratones, donde el fenotipo astroglial y oligodendroglial (NG2⁺) eran excluyentes (Brazel y col., 2005). La decisión entre ambos linajes gliales también es un proceso controlado; por ejemplo, se ha determinado que la inhibición de p57Kip2 en células madre adultas SOX2⁺ conduce a un descenso de la diferenciación astroglial y un aumento de la diferenciación hacia oligodendrocito tanto *in vivo* como *in vitro* (Jadasz y col., 2012b).

Por último, tras el experimento de diferenciación no se observaron células neuronales MAP2⁺. A pesar de que estos resultados indican que las células SOX2⁺ poseen competencia para generar células de ambos linajes gliales como la establecida *in vitro* para los progenitores gliales descritos anteriormente. Otros trabajos han comprobado que las células SOX2⁺ pueden generar neuronas bajo las condiciones adecuadas (Ellis y col., 2004; Wang y col., 2010a). Por esa razón, quizás nuestras células puedan actuar como verdaderas células madre *in vitro* y no sólo como progenitores gliales, tal y como ocurrió con la descripción de las células A2B5⁺ (Roy y col., 1999; Nunes y col., 2003). Aunque se trata de una posibilidad interesante, durante este proyecto no se ha profundizado en ella por no entrar en los objetivos iniciales planteados.

Con el fin de comprobar si también las poblaciones adherentes eran capaces de generar oligodendrocitos, sometimos ambas poblaciones de células adherentes y las células en esfera a un ensayo de diferenciación que consistía en un primer tratamiento de estimulación epigenética (adición de PDGF α , bFGF y NT3) que favorece la proliferación y la supervivencia de la subpoblación capaz de generar oligodendrocitos, seguida de una diferenciación espontánea mediante la adición de suero. La señalización a través de la vía PDGF/PDGFR α tiene efectos distintos en función del estadio de diferenciación de los diferentes progenitores: proporciona señales favoreciendo la proliferación y migración en progenitores de oligodendrocitos murinos (Calver y col., 1998) y humanos (Wilson y col., 2003), mientras que más tarde en el desarrollo tiene un mayor efecto en la supervivencia (Gogate y col., 1994). Esta doble función de PDGF α en proliferación y supervivencia están mediados en parte por la activación de integrinas, con un papel principal de la integrina $\alpha 6 \beta 1$ (Colognato y col., 2002; Baron y col., 2003; Pluchino y col., 2009). Además, se ha comprobado que la Neurotrofina 3 colabora con el PDGF α estimulando la proliferación *in vitro*, y es necesario para el correcto desarrollo de los oligodendrocitos *in vivo* (Barres y col., 1994). De igual manera, el bFGF tiene un papel importante favoreciendo la

proliferación y bloqueando la diferenciación de los progenitores de oligodendrocitos, en parte gracias a la modulación de la expresión de los receptores PDGFR α (McKinnon y col., 1990). Por último, para favorecer la diferenciación espontánea, en la segunda fase se añadió suero fetal bovino, dado que se ha determinado que el suero favorece la diferenciación oligodendroglial a través de la inhibición de NOTCH1. Además, se suplementó con hormona tiroidea (T3), una señal clave en el desarrollo del cerebro y los oligodendrocitos, y también en estadios finales en la regulación de la expresión de los genes de mielina (Park y col., 2001; Billon y col., 2002).

Tras el experimento, únicamente se consiguieron detectar cambios morfológicos y la aparición de células MBP⁺ en las muestras de neurosfera, mientras que en las células adherentes no se hallaron ni células con marcadores mucho más tempranos, como O4. Para comprobar posibles cambios a nivel de expresión molecular de marcadores de diferenciación e indiferenciación, estas últimas muestras fueron estudiaron por PCR. El análisis reveló una pérdida de marcadores de indiferenciación y de diferenciación astrocitarios, pero no la aparición de marcadores oligodendrogiales relevantes.

Por lo tanto, podemos concluir finalmente que la población SOX2⁺ aislada de sustancia blanca humana adulta se comporta como una población de progenitores gliales, capaz de generar células oligodendrogiales O4⁺, y, en menor medida, células GFAP⁺, además de poder generar células MBP⁺ en las condiciones adecuadas.

No se conoce mucho acerca de los mecanismos por los cuales SOX2 puede controlar procesos tan antagónicos como la autorenovación y la diferenciación en las células madre neurales adultas. Por ejemplo, estudios genéticos (Sharov y col., 2008; Engelen y col., 2011) han encontrado secuencias reguladoras de unión a SOX2 en los miembros de la familia *SOXD*, *SOX5* y *SOX6*, que interfieren con los factores del grupo SOXE, promotores de la diferenciación oligodendroglial. A la vez, SOX2 también actúa como activador de *SOX11*, un factor de transcripción expresado en la especificación temprana hacia oligodendrocito, que se pierde con tras la diferenciación terminal. Otros genes relacionados con la diferenciación oligodendroglial, como *PDGFR α* , *OLIG2*, o *NG2*, también parecen responder directamente a las variaciones de expresión de SOX2 (Wang y col., 2010a). Esta misma dualidad también aparece reflejada en la vía de señalización más relacionada con SOX2 en la literatura, la vía de NOTCH1 (Neves y col., 2011; Wang y col., 2012).

En la parte final del proyecto hemos identificado una pequeña subpoblación de células SOX2⁺ en la sustancia blanca humana adulta, gracias a que, a diferencia de

otros marcadores, SOX2 puede ser detectada por inmunohistoquímica. Los estudios anteriores, centrados en el estudio de tumores gliales (Phi y col., 2008) o patologías epileptogénicas (Orlova y col., 2010), han demostrado que existían células SOX2⁺ en el córtex temporal obtenido de tejido normal postmortem, pero consideraron su número poco significativo. En este último estudio se detectó un ligero aumento de las células SOX2⁺ en la esclerosis mesial temporal, aunque no resultó estadísticamente significativo, a diferencia de los recuentos realizados en otro tipo de enfermedades epilepticas como la displasia cortical focal tipo II o síndrome de síndrome de PMSE (polihidramnios, megalencefalia, y epilepsia sintomática), donde sí se observaba un aumento importante de la población SOX2⁺. En este caso, los estudios RMN e inmunohistoquímica para descartar anomalías estructurales en las muestras estudiadas, han permitido dar una mayor validez al hallazgo de este nuevo tipo celular.

Durante la caracterización de estas células SOX2⁺, no se encontró coinmunolocalización con el marcador de neurona madura NeuN ni con la proteína de oligodendrocito diferenciado CNP, y asimismo, se descartó su identidad microglial. En cambio, se encontró que una pequeña fracción de células GFAP⁺ era SOX2⁺, generalmente con una morfología diferente a la del astrocito fibroso típico de sustancia blanca. Este detalle contrasta con la distribución descrita en ratón y rata, donde virtualmente todas las células SOX2⁺ dispersas a lo largo del córtex corresponden a astrocitos GFAP⁺ (Komitova y Eriksson, 2004; Brazel y col., 2005). En nuestro tejido, las células SOX2⁺ GFAP⁺ podrían corresponderse con glía reactiva debido a daño epileptico, un factor que se ha visto que es suficiente para reactivar la expresión de SOX2 en astrocitos quiescentes (Bani-Yaghoub y col., 2006). Esta idea también podría explicar el leve aumento de células SOX2⁺ en la esclerosis mesial. Por lo tanto, podríamos tener una situación similar a la observada cuando los progenitores de oligodendrocitos fueron descritos por primera vez en tejido humano, donde un pequeño porcentaje de estas células era GFAP⁺ en las muestras epilepticas, pero este fenotipo estaba ausente en tejido normal *postmortem* (Scolding y col., 1999).

Por otro lado, se ha descrito una población que expresa mayores niveles de OLIG2 que los oligodendrocitos maduros, y que generalmente se identifica como células NG2/OLIG2 (Geha y col., 2010). Estas células se corresponden con prácticamente la totalidad de células proliferantes presente de forma natural en el cerebro humano adulto (Rhee y col., 2009; Geha y col., 2010). Además, se ha comprobado que, en ratones, generan oligodendrocitos maduros como parte del reemplazo normal de oligodendrocitos en sustancia blanca. Asimismo, las placas de

desmielinización por la esclerosis múltiple son capaces de reclutar células OLIG2⁺ (Tripathi y col., 2010), llegando a formar oligodendrocitos maduros en lesiones tempranas. Por lo tanto, la colocación observada de OLIG2⁺ y SOX2⁺ indica que estas células podrían ser responsables de la remielinización espontánea observada en algunos pacientes (Chang y col., 2000).

Por lo tanto, de acuerdo a su inmunofenotipo *in situ*, el comportamiento de las células *in vitro*, y las descripciones previas de células progenitoras en este tejido, nuestros datos sugieren que la población de células SOX2⁺ puede representar una fuente de progenitores gliales dentro del parénquima del cerebro humano adulto. Un abordaje que permitiera el aislamiento directo de estas células SOX2⁺, como ya se ha hecho para tejido fetal (Wang y col., 2010a), permitiría determinar si existe una correspondencia total entre las células SOX2 en cultivo y las células SOX2 en tejido. En cualquier caso, el descubrimiento de este nuevo tipo de progenitor celular abre la posibilidad para el diseño de estrategias de terapia celular dirigidas a la movilización de estas células hacia las áreas dañadas para acometer un reemplazo funcional.

Por otra parte, nuestros cultivos celulares no sólo servirían modelo *in vitro* para poder caracterizar su respuesta a distintas señales proliferativas y potencial de diferenciación, sino que también permitirían abordar la posibilidad de expandir las células previamente a la implantación en el paciente. En este sentido, la limitada capacidad proliferativa de las células SOX2⁺ podría resultar un impedimento de cara a una posible terapia. No obstante, esta restricción podría ser salvada mediante la reprogramación celular: gracias a que las células ya expresan de forma natural el factor SOX2, el número de genes a inducir es menor, lo que aumenta la eficacia de la técnica. Se ha comprobado que CMN de ratón SOX2⁺ pueden ser transformadas en IPSc mediante la inducción de un único factor (OCT 3/4) (Kim y col., 2009). Aún más, mediante la recién descrita técnica de *cell-penetrating peptides* (CPPs) (Thier y col., 2012), se podrían obtener células IPS sin la necesidad de introducir secuencias génicas, evitando los posibles riesgos asociados a la introducción de dichas secuencias.

Finalmente, el descubrimiento de esta población también puede resultar relevante en la búsqueda de células iniciadoras de glioma. Hasta la fecha, el origen último de los tumores gliales es desconocido, y los intentos por correlacionarlos con las células madre de la ZSV han sido infructuosos (Kappadakunnel y col., 2010). Por el contrario, hay una creciente acumulación de evidencias que sugieren que estas células comparten muchas características con progenitores gliales, como la expresión de

marcadores (PDGFB, OLIG2) o el hecho que células A2B5⁺ se comporten como células madre tumorales *in vitro* (Ogden y col., 2008; Lindberg y col., 2009; Sugiarto y col., 2011). Además, estudios previos en glioblastoma han determinado que, si bien es cierto que SOX2 está sobreexpresado de forma variable en el tejido tumoral (Phi y col., 2008; Alonso y col., 2011; Annovazzi y col., 2011), las células SOX2⁺ actúan *in vitro* como células iniciadoras de tumores, perdiendo su capacidad tumorigénica con su silenciamiento (Gangemi y col., 2009). Nosotros describimos aquí una población que reúne ambos criterios, y, por consiguiente, es un serio candidato a tener en cuenta en investigaciones futuras sobre gliomagénesis.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Como ya se ha comentado en la discusión, el descubrimiento de la población SOX2⁺ tanto *in vivo* como *in vitro* supone un punto de partida que puede dar lugar a un número considerable de líneas de trabajo de diversa índole, de forma similar a lo que ha ocurrido con el resto de progenitores gliales. Por ello, nos gustaría finalizar la tesis reseñando algunas de las posibles direcciones que podrían tomar dichas investigaciones:

- En primer lugar, este trabajo podría complementarse del siguiente modo, para confirmar los resultados obtenidos:
 - Aislamiento dirigido de células SOX2⁺ para confirmar la correspondencia entre los resultados *in vivo* o *in vitro*. Para ello, sería necesario la introducción de una secuencia que actúe como reportero de la expresión de SOX2.
 - Comprobación del comportamiento de las células SOX2 *in vivo* mediante xenotransplantes en modelos de animales con desmielinización.
- Generación de células pluripotentes inducidas a partir de células SOX2⁺. Dado que la expansión de estas células en nuestras condiciones parecía muy limitada, esta podría resultar una solución para conseguir un número suficiente con fines terapéuticos o experimentales. Con este fin, resultan especialmente interesantes las nuevas técnicas basadas en transducción directa de proteínas del resto de factores necesarios para la reprogramación, a través de los denominados *cell-penetrating peptides* (CPPs) (Thier y col., 2012).
- Estudios sobre el potencial gliomagénico de las células SOX2⁺, para poder determinar su posible papel como células iniciadoras de tumores.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. A través del protocolo estándar es posible obtener cultivos de células proliferantes que crecen en forma de monocapa. Estas células pueden dividirse un número limitado de veces antes de entrar en quiescencia, sufriendo cambios morfológicos y de expresión a lo largo de los pases.
2. La introducción en el protocolo de una centrifugación en una solución de sacarosa permite el aislamiento de una población celular que se expande como grupos de células flotante (esferas). Estas células flotantes generan un cultivo adherente que puede ser subcultivado de forma separada.
3. Las células que se expanden en forma de esfera se caracterizan por la expresión de SOX2 y de un mayor número de marcadores de progenitor glial.
4. Las células SOX2⁺ son progenitores gliales, capaces de generar de forma intrínseca células de linaje oligodendroglial O4⁺ y, en menor medida, células de fenotipo astrogial GFAP⁺.
5. Existe una población celular SOX2⁺ en la sustancia blanca humana adulta. Estas células únicamente colocalizan con el marcador OLIG2, y, de forma aislada, con el marcador astrocitario GFAP.

BIBLIOGRAFÍA

- Abad, P., M. Perez, E. Castro, T. Alarcon, R. Santibanez, F. Diaz (2010). [Prevalence of multiple sclerosis in Ecuador]. *Neurologia* **25**(5): 309-313.
- Acheson, E. D., C. A. Bachrach, F. M. Wright (1960). Some comments on the relationship of the distribution of multiple sclerosis to latitude, solar radiation, and other variables. *Acta Psychiatr Scand Suppl* **35**(147): 132-147.
- Adachi, K., H. Suemori, S. Y. Yasuda, N. Nakatsuji, E. Kawase (2010). Role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells. *Genes Cells* **15**(5): 455-470.
- Akiyama, Y., O. Honmou, T. Kato, T. Uede, K. Hashi, J. D. Kocsis (2001). Transplantation of clonal neural precursor cells derived from adult human brain establishes functional peripheral myelin in the rat spinal cord. *Exp Neurol* **167**(1): 27-39.
- Alonso, M. M., R. Diez-Valle, L. Manterola, A. Rubio, D. Liu, N. Cortes-Santiago, L. Urquiza, P. Jauregi, A. Lopez de Munain, N. Sampron, A. Aramburu, S. Tejada-Solis, C. Vicente, M. D. Otero, E. Bandres, J. Garcia-Foncillas, M. A. Idoate, F. F. Lang, J. Fueyo, C. Gomez-Manzano (2011). Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas. *PLoS One* **6**(11): e26740.
- Annovazzi, L., M. Mellai, V. Caldera, G. Valente, D. Schiffer (2011). SOX2 expression and amplification in gliomas and glioma cell lines. *Cancer Genomics Proteomics* **8**(3): 139-147.
- Armstrong, R. C., H. H. Dorn, C. V. Kufta, E. Friedman, M. E. Dubois-Dalcq (1992). Pre-oligodendrocytes from adult human CNS. *J Neurosci* **12**(4): 1538-1547.
- Avellana-Adalid, V., B. Nait-Oumesmar, F. Lachapelle, A. Baron-Van Evercooren (1996). Expansion of rat oligodendrocyte progenitors into proliferative "oligospheres" that retain differentiation potential. *J Neurosci Res* **45**(5): 558-570.
- Avilion, A. A., S. K. Nicolis, L. H. Pevny, L. Perez, N. Vivian, R. Lovell-Badge (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* **17**(1): 126-140.
- Ayuso-Sacido, A., N. S. Roy, T. H. Schwartz, J. P. Greenfield, J. A. Boockvar (2008). Long-term expansion of adult human brain subventricular zone precursors. *Neurosurgery* **62**(1): 223-229; discussion 229-231.
- Babu, H., G. Cheung, H. Kettenmann, T. D. Palmer, G. Kempermann (2007). Enriched monolayer precursor cell cultures from micro-dissected adult mouse dentate gyrus yield functional granule cell-like neurons. *PLoS One* **2**(4): e388.
- Baer, K., P. S. Eriksson, R. L. Faull, M. I. Rees, M. A. Curtis (2007). Sox-2 is expressed by glial and progenitor cells and Pax-6 is expressed by neuroblasts in the human subventricular zone. *Exp Neurol* **204**(2): 828-831.
- Bani-Yaghoub, M., R. G. Tremblay, J. X. Lei, D. Zhang, B. Zurakowski, J. K. Sandhu, B. Smith, M. Ribocco-Lutkiewicz, J. Kennedy, P. R. Walker, M. Sikorska (2006). Role of Sox2 in the development of the mouse neocortex. *Dev Biol* **295**(1): 52-66.
- Barnett, M. H., J. W. Prineas (2004). Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol* **55**(4): 458-468.

- Baron, W., L. Decker, H. Colognato, C. French-Constant (2003). Regulation of integrin growth factor interactions in oligodendrocytes by lipid raft microdomains. *Curr Biol* **13**(2): 151-155.
- Barres, B. A., I. K. Hart, H. S. Coles, J. F. Burne, J. T. Voyvodic, W. D. Richardson, M. C. Raff (1992). Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* **70**(1): 31-46.
- Barres, B. A., M. C. Raff, F. Gaese, I. Bartke, G. Dechant, Y. A. Barde (1994). A crucial role for neurotrophin-3 in oligodendrocyte development. *Nature* **367**(6461): 371-375.
- Ben-Hur, T. (2011). Cell therapy for multiple sclerosis. *Neurotherapeutics* **8**(4): 625-642.
- Billon, N., C. Jolicoeur, Y. Tokumoto, B. Vennstrom, M. Raff (2002). Normal timing of oligodendrocyte development depends on thyroid hormone receptor alpha 1 (TRalpha1). *EMBO J* **21**(23): 6452-6460.
- Blagosklonny, M. V. (2011). Cell cycle arrest is not senescence. *Aging (Albany NY)* **3**(2): 94-101.
- Blagosklonny, M. V. (2012). Hypoxia, MTOR and autophagy: Converging on senescence or quiescence. *Autophagy* **9**(2).
- Bonaguidi, M. A., T. McGuire, M. Hu, L. Kan, J. Samanta, J. A. Kessler (2005). LIF and BMP signaling generate separate and discrete types of GFAP-expressing cells. *Development* **132**(24): 5503-5514.
- Bonaguidi, M. A., C. Y. Peng, T. McGuire, G. Falciglia, K. T. Gobeske, C. Czeisler, J. A. Kessler (2008). Noggin expands neural stem cells in the adult hippocampus. *J Neurosci* **28**(37): 9194-9204.
- Brady, S. T., A. S. Witt, L. L. Kirkpatrick, S. M. de Waegh, C. Readhead, P. H. Tu, V. M. Lee (1999). Formation of compact myelin is required for maturation of the axonal cytoskeleton. *J Neurosci* **19**(17): 7278-7288.
- Brazel, C. Y., T. L. Limke, J. K. Osborne, T. Miura, J. Cai, L. Pevny, M. S. Rao (2005). Sox2 expression defines a heterogeneous population of neurosphere-forming cells in the adult murine brain. *Aging Cell* **4**(4): 197-207.
- Burns, J., A. Rosenzweig, B. Zweiman, R. P. Lisak (1983). Isolation of myelin basic protein-reactive T-cell lines from normal human blood. *Cell Immunol* **81**(2): 435-440.
- Butt, A. M., N. Hamilton, P. Hubbard, M. Pugh, M. Ibrahim (2005). Synantocytes: the fifth element. *J Anat* **207**(6): 695-706.
- Bylund, M., E. Andersson, B. G. Novitch, J. Muhr (2003). Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat Neurosci* **6**(11): 1162-1168.
- Calver, A. R., A. C. Hall, W. P. Yu, F. S. Walsh, J. K. Heath, C. Betsholtz, W. D. Richardson (1998). Oligodendrocyte population dynamics and the role of PDGF in vivo. *Neuron* **20**(5): 869-882.
- Cameron, R. S., P. Rakic (1991). Glial cell lineage in the cerebral cortex: a review and synthesis. *Glia* **4**(2): 124-137.

- Card, D. A., P. B. Hebbbar, L. Li, K. W. Trotter, Y. Komatsu, Y. Mishina, T. K. Archer (2008). Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* **28**(20): 6426-6438.
- Castro-Borrero, W., D. Graves, T. C. Frohman, A. B. Flores, P. Hardeman, D. Logan, M. Orchard, B. Greenberg, E. M. Frohman (2012). Current and emerging therapies in multiple sclerosis: a systematic review. *Ther Adv Neurol Disord* **5**(4): 205-220.
- Colello, R. J., C. Sato-Bigbee (2001). Purification of oligodendrocytes and their progenitors using immunomagnetic separation and Percoll gradient centrifugation. *Curr Protoc Neurosci* **Chapter 3**: Unit 3 12.
- Colognato, H., W. Baron, V. Avellana-Adalid, J. B. Relvas, A. Baron-Van Evercooren, E. Georges-Labouesse, C. ffrench-Constant (2002). CNS integrins switch growth factor signalling to promote target-dependent survival. *Nat Cell Biol* **4**(11): 833-841.
- Conway, G. D., M. A. O'Bara, B. H. Vedia, S. U. Pol, F. J. Sim (2012). Histone deacetylase activity is required for human oligodendrocyte progenitor differentiation. *Glia* **60**(12): 1944-1953.
- Corbin, J. G., N. Gaiano, S. L. Juliano, S. Poluch, E. Stancik, T. F. Haydar (2008). Regulation of neural progenitor cell development in the nervous system. *J Neurochem* **106**(6): 2272-2287.
- Corti, S., M. Nizzardo, M. Nardini, C. Donadoni, F. Locatelli, D. Papadimitriou, S. Salani, R. Del Bo, S. Ghezzi, S. Strazzer, N. Bresolin, G. P. Comi (2007). Isolation and characterization of murine neural stem/progenitor cells based on Prominin-1 expression. *Exp Neurol* **205**(2): 547-562.
- Corti, S., M. Nizzardo, C. Simone, M. Falcone, C. Donadoni, S. Salani, F. Rizzo, M. Nardini, G. Riboldi, F. Magri, C. Zanetta, I. Faravelli, N. Bresolin, G. P. Comi (2012). Direct reprogramming of human astrocytes into neural stem cells and neurons. *Exp Cell Res* **318**(13): 1528-1541.
- Coskun, V., H. Wu, B. Bianchi, S. Tsao, K. Kim, J. Zhao, J. C. Biancotti, L. Hutnick, R. C. Krueger, Jr., G. Fan, J. de Vellis, Y. E. Sun (2008). CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(3): 1026-1031.
- Cristiano, E., L. Patrucco, J. I. Rojas (2008). A systematic review of the epidemiology of multiple sclerosis in South America. *Eur J Neurol* **15**(12): 1273-1278.
- Cristiano, E., L. Patrucco, J. I. Rojas, F. Caceres, A. Carra, J. Correale, O. Garcea, L. Gold, J. Tessler, M. Kremenichutsky (2009). Prevalence of multiple sclerosis in Buenos Aires, Argentina using the capture-recapture method. *Eur J Neurol* **16**(2): 183-187.
- Chang, A., A. Nishiyama, J. Peterson, J. Prineas, B. D. Trapp (2000). NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain and multiple sclerosis lesions. *J Neurosci* **20**(17): 6404-6412.
- Chen, K., S. M. Hughes, B. Connor (2007a). Neural progenitor cells derived from the adult rat subventricular zone: characterization and transplantation. *Cell Transplant* **16**(8): 799-810.
- Chen, Y., V. Balasubramaniyan, J. Peng, E. C. Hurlock, M. Tallquist, J. Li, Q. R. Lu (2007b). Isolation and culture of rat and mouse oligodendrocyte precursor cells. *Nat Protoc* **2**(5): 1044-1051.

- Chen, Y., L. Shi, L. Zhang, R. Li, J. Liang, W. Yu, L. Sun, X. Yang, Y. Wang, Y. Zhang, Y. Shang (2008). The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer. *J Biol Chem* **283**(26): 17969-17978.
- Chew, L. J., V. Gallo (2009). The Yin and Yang of Sox proteins: Activation and repression in development and disease. *J Neurosci Res* **87**(15): 3277-3287.
- Dean, G. (1967). Annual incidence, prevalence, and mortality of multiple sclerosis in white South-African-born and in white immigrants to South Africa. *Br Med J* **2**(5554): 724-730.
- Dean, G., M. Elian (1997). Age at immigration to England of Asian and Caribbean immigrants and the risk of developing multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **63**(5): 565-568.
- Deng, Z., W. W. Du, L. Fang, S. W. Shan, J. Qian, J. Lin, W. Qian, J. Ma, Z. J. Rutnam, B. B. Yang (2012). The intermediate filament vimentin mediates microRNA miR-378 function in cellular self-renewal by regulating the expression of the Sox2 transcription factor. *J Biol Chem*.
- Dickinson, P. J., M. L. Fanarraga, I. R. Griffiths, J. M. Barrie, E. Kyriakides, P. Montague (1996). Oligodendrocyte progenitors in the embryonic spinal cord express DM-20. *Neuropathol Appl Neurobiol* **22**(3): 188-198.
- Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith, et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(20): 9363-9367.
- Doetsch, F., A. Alvarez-Buylla (1996). Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(25): 14895-14900.
- Einstein, O., D. Karussis, N. Grigoriadis, R. Mizrahi-Kol, E. Reinhartz, O. Abramsky, T. Ben-Hur (2003). Intraventricular transplantation of neural precursor cell spheres attenuates acute experimental allergic encephalomyelitis. *Mol Cell Neurosci* **24**(4): 1074-1082.
- Ellis, P., B. M. Fagan, S. T. Magness, S. Hutton, O. Taranova, S. Hayashi, A. McMahon, M. Rao, L. Pevny (2004). SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Dev Neurosci* **26**(2-4): 148-165.
- Engelen, E., U. Akinci, J. C. Bryne, J. Hou, C. Gontan, M. Moen, D. Szumska, C. Kockx, W. van Ijcken, D. H. Dekkers, J. Demmers, E. J. Rijkers, S. Bhattacharya, S. Philipsen, L. H. Pevny, F. G. Grosveld, R. J. Rottier, B. Lenhard, R. A. Poot (2011). Sox2 cooperates with Chd7 to regulate genes that are mutated in human syndromes. *Nat Genet* **43**(6): 607-611.
- Eriksson, P. S., E. Perfilieva, T. Bjork-Eriksson, A. M. Alborn, C. Nordborg, D. A. Peterson, F. H. Gage (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* **4**(11): 1313-1317.
- Espinosa-Jeffrey, A., D. R. Wakeman, S. U. Kim, E. Y. Snyder, J. de Vellis (2009). Culture system for rodent and human oligodendrocyte specification, lineage progression, and maturation. *Curr Protoc Stem Cell Biol* **Chapter 2**: Unit 2D 4.
- Fainstein, N., I. Vaknin, O. Einstein, P. Zisman, S. Z. Ben Sasson, M. Baniyash, T. Ben-Hur (2008). Neural precursor cells inhibit multiple inflammatory signals. *Mol Cell Neurosci* **39**(3): 335-341.

- Farah, M. H., J. M. Olson, H. B. Sucic, R. I. Hume, S. J. Tapscott, D. L. Turner (2000). Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells. *Development* **127**(4): 693-702.
- Ferrer-Alcon, M., C. Winkler-Hirt, F. E. Perrin, A. C. Kato (2007). Grafted neural stem cells increase the life span and protect motoneurons in pmn mice. *Neuroreport* **18**(14): 1463-1468.
- Ferri, A. L., M. Cavallaro, D. Braidà, A. Di Cristofano, A. Canta, A. Vezzani, S. Ottolenghi, P. P. Pandolfi, M. Sala, S. DeBiasi, S. K. Nicolis (2004). Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development* **131**(15): 3805-3819.
- Ffrench-Constant, C., M. C. Raff (1986a). The oligodendrocyte-type-2 astrocyte cell lineage is specialized for myelination. *Nature* **323**(6086): 335-338.
- Ffrench-Constant, C., M. C. Raff (1986b). Proliferating bipotential glial progenitor cells in adult rat optic nerve. *Nature* **319**(6053): 499-502.
- Foote, A. K., W. F. Blakemore (2005). Repopulation of oligodendrocyte progenitor cell depleted tissue in a model of chronic demyelination. *Neuropathol Appl Neurobiol* **31**(2): 105-114.
- Fulton, B. P., J. F. Burne, M. C. Raff (1992). Visualization of O-2A progenitor cells in developing and adult rat optic nerve by quisqualate-stimulated cobalt uptake. *J Neurosci* **12**(12): 4816-4833.
- Gangemi, R. M., F. Griffero, D. Marubbi, M. Perera, M. C. Capra, P. Malatesta, G. L. Ravetti, G. L. Zona, A. Daga, G. Corte (2009). SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem Cells* **27**(1): 40-48.
- Garcia-Verdugo, J. M., S. Ferron, N. Flames, L. Collado, E. Desfilis, E. Font (2002). The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain Res Bull* **57**(6): 765-775.
- Geha, S., J. Pallud, M. P. Junier, B. Devaux, N. Leonard, F. Chassoux, H. Chneiweiss, C. Daumas-Duport, P. Varlet (2010). NG2+/Olig2+ cells are the major cycle-related cell population of the adult human normal brain. *Brain Pathol* **20**(2): 399-411.
- Geurts, J. J., L. Bo, S. D. Roosendaal, T. Hazes, R. Daniels, F. Barkhof, M. P. Witter, I. Huitinga, P. van der Valk (2007). Extensive hippocampal demyelination in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* **66**(9): 819-827.
- Gil-Perotin, S., A. Alvarez-Buylla, J. M. Garcia-Verdugo (2009). Identification and characterization of neural progenitor cells in the adult mammalian brain. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **203**: 1-101, ix.
- Giovannoni, G., G. Ebers (2007). Multiple sclerosis: the environment and causation. *Curr Opin Neurol* **20**(3): 261-268.
- Givogri, M. I., E. R. Bongarzone, V. Schonmann, A. T. Campagnoni (2001). Expression and regulation of golli products of myelin basic protein gene during in vitro development of oligodendrocytes. *J Neurosci Res* **66**(4): 679-690.

- Gogate, N., L. Verma, J. M. Zhou, E. Milward, R. Rusten, M. O'Connor, C. Kufta, J. Kim, L. Hudson, M. Dubois-Dalcq (1994). Plasticity in the adult human oligodendrocyte lineage. *J Neurosci* **14**(8): 4571-4587.
- Goldenberg, M. M. (2012). Multiple sclerosis review. *P T* **37**(3): 175-184.
- Gomez-Lopez, S., O. Wiskow, R. Favaro, S. K. Nicolis, D. J. Price, S. M. Pollard, A. Smith (2011). Sox2 and Pax6 maintain the proliferative and developmental potential of gliogenic neural stem cells In vitro. *Glia* **59**(11): 1588-1599.
- Goverman, J. (2009). Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* **9**(6): 393-407.
- Graham, V., J. Khudyakov, P. Ellis, L. Pevny (2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* **39**(5): 749-765.
- Guerrero-Cazares, H., O. Gonzalez-Perez, M. Soriano-Navarro, G. Zamora-Berridi, J. M. Garcia-Verdugo, A. Quinones-Hinojosa (2011). Cytoarchitecture of the lateral ganglionic eminence and rostral extension of the lateral ventricle in the human fetal brain. *J Comp Neurol* **519**(6): 1165-1180.
- Haberlandt, C., A. Derouiche, A. Wyczynski, J. Haseleu, J. Pohle, K. Karram, J. Trotter, G. Seifert, M. Frotscher, C. Steinhauser, R. Jabs (2011). Gray matter NG2 cells display multiple Ca²⁺-signaling pathways and highly motile processes. *PLoS One* **6**(3): e17575.
- Hafler, D. A. (2004). Multiple sclerosis. *J Clin Invest* **113**(6): 788-794.
- Hammond, S. R., J. G. McLeod, K. S. Millingen, E. G. Stewart-Wynne, D. English, J. T. Holland, M. G. McCall (1988). The epidemiology of multiple sclerosis in three Australian cities: Perth, Newcastle and Hobart. *Brain* **111** (Pt 1): 1-25.
- Hartline, D. K., D. R. Colman (2007). Rapid conduction and the evolution of giant axons and myelinated fibers. *Curr Biol* **17**(1): R29-35.
- Hassan, H. T., X. Zhai, J. A. Goodacre (2008). CD133 stem cells in adult human brain. *J Neurooncol* **89**(2): 247-248; author reply 249.
- Hauser S.L., G. D. S. (2008). *Multiple sclerosis and other demyelinating diseases*. Harrison's Principles of Internal Medicine. B. E. Fauci A.S., Kasper D..L, Hauser S.L. New York, McGraw-Hill Medical: 2611–2621.
- Hockertz, M. K., D. W. Paty, S. S. Beall (1998). Susceptibility to relapsing-progressive multiple sclerosis is associated with inheritance of genes linked to the variable region of the TcR beta locus: use of affected family-based controls. *Am J Hum Genet* **62**(2): 373-385.
- Hovelmeyer, N., Z. Hao, K. Kranidioti, G. Kassiotis, T. Buch, F. Frommer, L. von Hoch, D. Kramer, L. Minichiello, G. Kollias, H. Lassmann, A. Waisman (2005). Apoptosis of oligodendrocytes via Fas and TNF-R1 is a key event in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **175**(9): 5875-5884.
- Iglesias-Rozas, J. R., M. Garrosa (2012). The discovery of oligodendroglia cells by Rio-Hortega: his original articles. *Clin Neuropathol* **31**(6): 437-439.

- Imura, T., H. I. Kornblum, M. V. Sofroniew (2003). The predominant neural stem cell isolated from postnatal and adult forebrain but not early embryonic forebrain expresses GFAP. *J Neurosci* **23**(7): 2824-2832.
- Inoko, E., Y. Nishiura, H. Tanaka, T. Takahashi, K. Furukawa, K. Kitajima, C. Sato (2010). Developmental stage-dependent expression of an alpha2,8-trisialic acid unit on glycoproteins in mouse brain. *Glycobiology* **20**(7): 916-928.
- Irvin, D. K., S. D. Zurcher, T. Nguyen, G. Weinmaster, H. I. Kornblum (2001). Expression patterns of Notch1, Notch2, and Notch3 suggest multiple functional roles for the Notch-DSL signaling system during brain development. *J Comp Neurol* **436**(2): 167-181.
- Islam, M. O., Y. Kanemura, J. Tajria, H. Mori, S. Kobayashi, M. Hara, M. Yamasaki, H. Okano, J. Miyake (2005). Functional expression of ABCG2 transporter in human neural stem/progenitor cells. *Neurosci Res* **52**(1): 75-82.
- Jadasz, J. J., L. Aigner, F. J. Rivera, P. Kury (2012a). The remyelination Philosopher's Stone: stem and progenitor cell therapies for multiple sclerosis. *Cell Tissue Res* **349**(1): 331-347.
- Jadasz, J. J., F. J. Rivera, A. Taubert, M. Kandasamy, B. Sandner, N. Weidner, O. Aktas, H. P. Hartung, L. Aigner, P. Kury (2012b). p57kip2 regulates glial fate decision in adult neural stem cells. *Development* **139**(18): 3306-3315.
- Jakovcevski, I., N. Zecevic (2005a). Olig transcription factors are expressed in oligodendrocyte and neuronal cells in human fetal CNS. *J Neurosci* **25**(44): 10064-10073.
- Jakovcevski, I., N. Zecevic (2005b). Sequence of oligodendrocyte development in the human fetal telencephalon. *Glia* **49**(4): 480-491.
- Johansson, C. B., M. Svensson, L. Wallstedt, A. M. Janson, J. Frisen (1999). Neural stem cells in the adult human brain. *Exp Cell Res* **253**(2): 733-736.
- Kantarci, O. H., D. D. Hebrink, S. J. Achenbach, E. J. Atkinson, A. Waliszewska, G. Buckle, C. T. McMurray, M. de Andrade, D. A. Hafler, B. G. Weinshenker (2003). CTLA4 is associated with susceptibility to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **134**(1-2): 133-141.
- Kappadakunnel, M., A. Eskin, J. Dong, S. F. Nelson, P. S. Mischel, L. M. Liau, P. Ngheimphu, A. Lai, T. F. Cloughesy, J. Goldin, W. B. Pope (2010). Stem cell associated gene expression in glioblastoma multiforme: relationship to survival and the subventricular zone. *J Neurooncol* **96**(3): 359-367.
- Karimi-Abdolrezaee, S., E. Eftekharpour, J. Wang, C. M. Morshead, M. G. Fehlings (2006). Delayed transplantation of adult neural precursor cells promotes remyelination and functional neurological recovery after spinal cord injury. *J Neurosci* **26**(13): 3377-3389.
- Keirstead, H. S., W. F. Blakemore (1999). The role of oligodendrocytes and oligodendrocyte progenitors in CNS remyelination. *Adv Exp Med Biol* **468**: 183-197.
- Kim, J. B., V. Sebastiano, G. Wu, M. J. Arauzo-Bravo, P. Sasse, L. Gentile, K. Ko, D. Ruau, M. Ehrich, D. van den Boom, J. Meyer, K. Hubner, C. Bernemann, C. Ortmeier, M. Zenke, B. K. Fleischmann, H. Zaehres, H. R. Scholer (2009). Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* **136**(3): 411-419.

- Kishi, M., K. Mizuseki, N. Sasai, H. Yamazaki, K. Shiota, S. Nakanishi, Y. Sasai (2000). Requirement of Sox2-mediated signaling for differentiation of early *Xenopus* neuroectoderm. *Development* **127**(4): 791-800.
- Knoth, R., I. Singec, M. Ditter, G. Pantazis, P. Capetian, R. P. Meyer, V. Horvat, B. Volk, G. Kempermann (2010). Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PLoS One* **5**(1): e8809.
- Koch-Henriksen, N., P. S. Sorensen (2010). The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol* **9**(5): 520-532.
- Komitova, M., P. S. Eriksson (2004). Sox-2 is expressed by neural progenitors and astroglia in the adult rat brain. *Neurosci Lett* **369**(1): 24-27.
- Kuhlmann, T., V. Miron, Q. Cui, C. Wegner, J. Antel, W. Bruck (2008). Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. *Brain* **131**(Pt 7): 1749-1758.
- Kukekov, V. G., E. D. Laywell, L. B. Thomas, D. A. Steindler (1997). A nestin-negative precursor cell from the adult mouse brain gives rise to neurons and glia. *Glia* **21**(4): 399-407.
- Kurtzke, J. F. (1980). Geographic distribution of multiple sclerosis: An update with special reference to Europe and the Mediterranean region. *Acta Neurol Scand* **62**(2): 65-80.
- Kurtzke, J. F., G. W. Beebe, J. E. Norman, Jr. (1979). Epidemiology of multiple sclerosis in U.S. veterans: 1. Race, sex, and geographic distribution. *Neurology* **29**(9 Pt 1): 1228-1235.
- Lendahl, U., L. B. Zimmerman, R. D. McKay (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* **60**(4): 585-595.
- Leonard, B. W., D. Mastroeni, A. Grover, Q. Liu, K. Yang, M. Gao, J. Wu, D. Pootrakul, S. A. van den Berge, E. M. Hol, J. Rogers (2009). Subventricular zone neural progenitors from rapid brain autopsies of elderly subjects with and without neurodegenerative disease. *J Comp Neurol* **515**(3): 269-294.
- Lindberg, N., M. Kastemar, T. Olofsson, A. Smits, L. Uhrbom (2009). Oligodendrocyte progenitor cells can act as cell of origin for experimental glioma. *Oncogene* **28**(23): 2266-2275.
- Lobo, M. V., F. J. Alonso, C. Redondo, M. A. Lopez-Toledano, E. Caso, A. S. Herranz, C. L. Paino, D. Reimers, E. Bazan (2003). Cellular characterization of epidermal growth factor-expanded free-floating neurospheres. *J Histochem Cytochem* **51**(1): 89-103.
- Lois, C., A. Alvarez-Buylla (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* **264**(5162): 1145-1148.
- Lu, P., L. L. Jones, E. Y. Snyder, M. H. Tuszynski (2003). Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Exp Neurol* **181**(2): 115-129.
- Lucas, R. M., A. L. Ponsonby, K. Dear, P. C. Valery, M. P. Pender, B. V. Taylor, T. J. Kilpatrick, T. Dwyer, A. Coulthard, C. Chapman, I. van der Mei, D. Williams, A. J. McMichael (2011). Sun exposure and vitamin D are independent risk factors for CNS demyelination. *Neurology* **76**(6): 540-548.

- Lucchinetti, C., W. Bruck, J. Parisi, B. Scheithauer, M. Rodriguez, H. Lassmann (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* **47**(6): 707-717.
- Ludwin, S. K. (1979). The perineuronal satellite oligodendrocyte. A role in remyelination. *Acta Neuropathol* **47**(1): 49-53.
- Ludwin, S. K. (1997). The pathobiology of the oligodendrocyte. *J Neuropathol Exp Neurol* **56**(2): 111-124.
- Maeda, Y., M. Solanky, J. Menonna, J. Chapin, W. Li, P. Dowling (2001). Platelet-derived growth factor-alpha receptor-positive oligodendroglia are frequent in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* **49**(6): 776-785.
- Mahmood, U., V. K. Kaul, R. Acharya (2004). Volatile constituents of *Capillipedium parviflorum*. *Phytochemistry* **65**(14): 2163-2166.
- Maric, D., I. Maric, J. L. Barker (1998). Buoyant density gradient fractionation and flow cytometric analysis of embryonic rat cortical neurons and progenitor cells. *Methods* **16**(3): 247-259.
- Marti-Fabregas, J., M. Romaguera-Ros, U. Gomez-Pinedo, S. Martinez-Ramirez, E. Jimenez-Xarrie, R. Marin, J. L. Marti-Vilalta, J. M. Garcia-Verdugo (2010). Proliferation in the human ipsilateral subventricular zone after ischemic stroke. *Neurology* **74**(5): 357-365.
- Martino, G., S. Pluchino (2006). The therapeutic potential of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* **7**(5): 395-406.
- Masui, S., Y. Nakatake, Y. Toyooka, D. Shimosato, R. Yagi, K. Takahashi, H. Okochi, A. Okuda, R. Matoba, A. A. Sharov, M. S. Ko, H. Niwa (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* **9**(6): 625-635.
- McKinnon, R. D., T. Matsui, M. Dubois-Dalcq, S. A. Aaronson (1990). FGF modulates the PDGF-driven pathway of oligodendrocyte development. *Neuron* **5**(5): 603-614.
- McTigue, D. M., R. B. Tripathi (2008). The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. *J Neurochem* **107**(1): 1-19.
- Menn, B., J. M. Garcia-Verdugo, C. Yaschine, O. Gonzalez-Perez, D. Rowitch, A. Alvarez-Buylla (2006). Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci* **26**(30): 7907-7918.
- Messam, C. A., J. Hou, E. O. Major (2000). Coexpression of nestin in neural and glial cells in the developing human CNS defined by a human-specific anti-nestin antibody. *Exp Neurol* **161**(2): 585-596.
- Mirzadeh, Z., F. T. Merkle, M. Soriano-Navarro, J. M. Garcia-Verdugo, A. Alvarez-Buylla (2008). Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* **3**(3): 265-278.
- Molofsky, A. V., R. Pardal, T. Iwashita, I. K. Park, M. F. Clarke, S. J. Morrison (2003). Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* **425**(6961): 962-967.

- Morshead, C. M., B. A. Reynolds, C. G. Craig, M. W. McBurney, W. A. Staines, D. Morassutti, S. Weiss, D. van der Kooy (1994). Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* **13**(5): 1071-1082.
- Mothe, A. J., T. Zahir, C. Santaguida, D. Cook, C. H. Tator (2011). Neural stem/progenitor cells from the adult human spinal cord are multipotent and self-renewing and differentiate after transplantation. *PLoS One* **6**(11): e27079.
- Mycko, M. P., M. Kwinkowski, E. Tronczynska, B. Szymanska, K. W. Selmaj (1998). Multiple sclerosis: the increased frequency of the ICAM-1 exon 6 gene point mutation genetic type K469. *Ann Neurol* **44**(1): 70-75.
- Nait-Oumesmar, B., N. Picard-Riera, C. Kerninon, L. Decker, D. Seilhean, G. U. Hoglinger, E. C. Hirsch, R. Reynolds, A. Baron-Van Evercooren (2007). Activation of the subventricular zone in multiple sclerosis: evidence for early glial progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(11): 4694-4699.
- Nakano, I., A. A. Paucar, R. Bajpai, J. D. Dougherty, A. Zewail, T. K. Kelly, K. J. Kim, J. Ou, M. Groszer, T. Imura, W. A. Freije, S. F. Nelson, M. V. Sofroniew, H. Wu, X. Liu, A. V. Tersikh, D. H. Geschwind, H. I. Kornblum (2005). Maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) regulates multipotent neural progenitor proliferation. *J Cell Biol* **170**(3): 413-427.
- Neves, J., C. Parada, M. Chamizo, F. Giraldez (2011). Jagged 1 regulates the restriction of Sox2 expression in the developing chicken inner ear: a mechanism for sensory organ specification. *Development* **138**(4): 735-744.
- Nieto, M., C. Schuurmans, O. Britz, F. Guillemot (2001). Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron* **29**(2): 401-413.
- Noseworthy, J. H., C. Lucchinetti, M. Rodriguez, B. G. Weinshenker (2000). Multiple sclerosis. *N Engl J Med* **343**(13): 938-952.
- Nunes, M. C., N. S. Roy, H. M. Keyoung, R. R. Goodman, G. McKhann, 2nd, L. Jiang, J. Kang, M. Nedergaard, S. A. Goldman (2003). Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain. *Nat Med* **9**(4): 439-447.
- Ogden, A. T., A. E. Waziri, R. A. Lochhead, D. Fusco, K. Lopez, J. A. Ellis, J. Kang, M. Assanah, G. M. McKhann, M. B. Sisti, P. C. McCormick, P. Canoll, J. N. Bruce (2008). Identification of A2B5+CD133- tumor-initiating cells in adult human gliomas. *Neurosurgery* **62**(2): 505-514; discussion 514-505.
- Orlova, K. A., V. Tsai, M. Baybis, G. G. Heuer, S. Sisodiya, M. Thom, K. Strauss, E. Aronica, P. B. Storm, P. B. Crino (2010). Early progenitor cell marker expression distinguishes type II from type I focal cortical dysplasias. *J Neuropathol Exp Neurol* **69**(8): 850-863.
- Otero, S., J. Batlle, I. Bonaventura, L. Brieva, E. Bufill, A. Cano, O. Carmona, A. Escartin, M. Marco, E. Moral, E. Munteis, C. Nos, I. Pericot, H. Perkal, L. Ramio-Torrenta, C. Ramo-Tello, A. Saiz, J. Sastre-Garriga, M. Tintore, J. Vaque, X. Montalban (2010). [Multiple sclerosis epidemiological situation update: pertinence and set-up of a population based registry of new cases in Catalonia]. *Rev Neurol* **50**(10): 623-633.

- Palmer, T. D., E. A. Markakis, A. R. Willhoite, F. Safar, F. H. Gage (1999). Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci* **19**(19): 8487-8497.
- Palmer, T. D., P. H. Schwartz, P. Taupin, B. Kaspar, S. A. Stein, F. H. Gage (2001). Cell culture. Progenitor cells from human brain after death. *Nature* **411**(6833): 42-43.
- Park, S. K., D. Solomon, T. Vartanian (2001). Growth factor control of CNS myelination. *Dev Neurosci* **23**(4-5): 327-337.
- Patel, J., R. Balabanov (2012). Molecular mechanisms of oligodendrocyte injury in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int J Mol Sci* **13**(8): 10647-10659.
- Pevny, L., M. Placzek (2005). SOX genes and neural progenitor identity. *Curr Opin Neurobiol* **15**(1): 7-13.
- Pflieger, C. C., E. M. Flachs, N. Koch-Henriksen (2010). Social consequences of multiple sclerosis: clinical and demographic predictors - a historical prospective cohort study. *Eur J Neurol* **17**(11): 1346-1351.
- Phi, J. H., S. H. Park, S. K. Kim, S. H. Paek, J. H. Kim, Y. J. Lee, B. K. Cho, C. K. Park, D. H. Lee, K. C. Wang (2008). Sox2 expression in brain tumors: a reflection of the neuroglial differentiation pathway. *Am J Surg Pathol* **32**(1): 103-112.
- Picard-Riera, N., L. Decker, C. Delarasse, K. Goude, B. Nait-Oumesmar, R. Liblau, D. Pham-Dinh, A. B. Evercooren (2002). Experimental autoimmune encephalomyelitis mobilizes neural progenitors from the subventricular zone to undergo oligodendrogenesis in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(20): 13211-13216.
- Pluchino, S., A. Gritti, E. Blezer, S. Amadio, E. Brambilla, G. Borsellino, C. Cossetti, U. Del Carro, G. Comi, B. t Hart, A. Vescovi, G. Martino (2009). Human neural stem cells ameliorate autoimmune encephalomyelitis in non-human primates. *Ann Neurol* **66**(3): 343-354.
- Pluchino, S., L. Zanotti, B. Rossi, E. Brambilla, L. Ottoboni, G. Salani, M. Martinello, A. Cattalini, A. Bergami, R. Furlan, G. Comi, G. Constantin, G. Martino (2005). Neurosphere-derived multipotent precursors promote neuroprotection by an immunomodulatory mechanism. *Nature* **436**(7048): 266-271.
- Prineas, J. W., E. E. Kwon, P. Z. Goldenberg, A. A. Ilyas, R. H. Quarles, J. A. Benjamins, T. J. Sprinkle (1989). Multiple sclerosis. Oligodendrocyte proliferation and differentiation in fresh lesions. *Lab Invest* **61**(5): 489-503.
- Pringle, N. P., H. S. Mudhar, E. J. Collarini, W. D. Richardson (1992). PDGF receptors in the rat CNS: during late neurogenesis, PDGF alpha-receptor expression appears to be restricted to glial cells of the oligodendrocyte lineage. *Development* **115**(2): 535-551.
- Quinones-Hinojosa, A., N. Sanai, M. Soriano-Navarro, O. Gonzalez-Perez, Z. Mirzadeh, S. Gil-Perotin, R. Romero-Rodriguez, M. S. Berger, J. M. Garcia-Verdugo, A. Alvarez-Buylla (2006). Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J Comp Neurol* **494**(3): 415-434.
- Raff, M. C., R. H. Miller, M. Noble (1983a). Glial cell lineages in the rat optic nerve. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **48 Pt 2**: 569-572.

- Raff, M. C., R. H. Miller, M. Noble (1983b). A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* **303**(5916): 390-396.
- Raine, C. S. (1991). *Oligodendrocytes and Central Nervous System Myelin*. Textbook of Neuropathology. R. D. M. Davis R.L. Baltimore, MD, USA, Williams and Wilkins: 115–141.
- Raine, C. S., L. Scheinberg, J. M. Waltz (1981). Multiple sclerosis. Oligodendrocyte survival and proliferation in an active established lesion. *Lab Invest* **45**(6): 534-546.
- Rasmussen, S., J. Imitola, A. Ayuso-Sacido, Y. Wang, S. C. Starossom, P. Kivisakk, B. Zhu, M. Meyer, R. T. Bronson, J. M. Garcia-Verdugo, S. J. Khoury (2011). Reversible neural stem cell niche dysfunction in a model of multiple sclerosis. *Ann Neurol* **69**(5): 878-891.
- Reynolds, B. A., W. Tetzlaff, S. Weiss (1992). A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci* **12**(11): 4565-4574.
- Reynolds, B. A., S. Weiss (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* **255**(5052): 1707-1710.
- Rhee, W., S. Ray, H. Yokoo, M. E. Hoane, C. C. Lee, A. M. Mikheev, P. J. Horner, R. C. Rostomily (2009). Quantitative analysis of mitotic Olig2 cells in adult human brain and gliomas: implications for glioma histogenesis and biology. *Glia* **57**(5): 510-523.
- Richardson, W. D., K. M. Young, R. B. Tripathi, I. McKenzie (2011). NG2-glia as multipotent neural stem cells: fact or fantasy? *Neuron* **70**(4): 661-673.
- Rietze, R. L., B. A. Reynolds (2006). Neural stem cell isolation and characterization. *Methods Enzymol* **419**: 3-23.
- Robinson, M. A., T. J. Kindt (1992). Linkage between T cell receptor genes and susceptibility to multiple sclerosis: a complex issue. *Reg Immunol* **4**(5): 274-283.
- Rodriguez, M., B. W. Scheithauer, G. Forbes, P. J. Kelly (1993). Oligodendrocyte injury is an early event in lesions of multiple sclerosis. *Mayo Clin Proc* **68**(7): 627-636.
- Roosendaal, S. D., H. E. Hulst, H. Vrenken, H. E. Feenstra, J. A. Castelijns, P. J. Pouwels, F. Barkhof, J. J. Geurts (2010). Structural and functional hippocampal changes in multiple sclerosis patients with intact memory function. *Radiology* **255**(2): 595-604.
- Roy, N. S., S. Wang, C. Harrison-Restelli, A. Benraiss, R. A. Fraser, M. Gravel, P. E. Braun, S. A. Goldman (1999). Identification, isolation, and promoter-defined separation of mitotic oligodendrocyte progenitor cells from the adult human subcortical white matter. *J Neurosci* **19**(22): 9986-9995.
- Roy, N. S., S. Wang, L. Jiang, J. Kang, A. Benraiss, C. Harrison-Restelli, R. A. Fraser, W. T. Couldwell, A. Kawaguchi, H. Okano, M. Nedergaard, S. A. Goldman (2000). In vitro neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. *Nat Med* **6**(3): 271-277.
- Ruffini, F., N. Arbour, M. Blain, A. Olivier, J. P. Antel (2004). Distinctive properties of human adult brain-derived myelin progenitor cells. *Am J Pathol* **165**(6): 2167-2175.

- Sanai, N., T. Nguyen, R. A. Ihrie, Z. Mirzadeh, H. H. Tsai, M. Wong, N. Gupta, M. S. Berger, E. Huang, J. M. Garcia-Verdugo, D. H. Rowitch, A. Alvarez-Buylla (2011). Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature* **478**(7369): 382-386.
- Sanai, N., A. D. Tramontin, A. Quinones-Hinojosa, N. M. Barbaro, N. Gupta, S. Kunwar, M. T. Lawton, M. W. McDermott, A. T. Parsa, J. Manuel-Garcia Verdugo, M. S. Berger, A. Alvarez-Buylla (2004). Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* **427**(6976): 740-744.
- Scolding, N., R. Franklin, S. Stevens, C. H. Heldin, A. Compston, J. Newcombe (1998). Oligodendrocyte progenitors are present in the normal adult human CNS and in the lesions of multiple sclerosis. *Brain* **121** (Pt 12): 2221-2228.
- Scolding, N. J., P. J. Rayner, D. A. Compston (1999). Identification of A2B5-positive putative oligodendrocyte progenitor cells and A2B5-positive astrocytes in adult human white matter. *Neuroscience* **89**(1): 1-4.
- Scolding, N. J., P. J. Rayner, J. Sussman, C. Shaw, D. A. Compston (1995). A proliferative adult human oligodendrocyte progenitor. *Neuroreport* **6**(3): 441-445.
- Schneider, A., T. Bardakjian, L. M. Reis, R. C. Tyler, E. V. Semina (2009). Novel SOX2 mutations and genotype-phenotype correlation in anophthalmia and microphthalmia. *Am J Med Genet A* **149A**(12): 2706-2715.
- Schumacher, T., M. Krohn, J. Hofrichter, C. Lange, J. Stenzel, J. Steffen, T. Dunkelmann, K. Paarmann, C. Frohlich, A. Uecker, A. S. Plath, A. Sommer, T. Bruning, H. J. Heinze, J. Pahnke (2012). ABC transporters B1, C1 and G2 differentially regulate neuroregeneration in mice. *PLoS One* **7**(4): e35613.
- Schwartz, P. H., P. J. Bryant, T. J. Fuja, H. Su, D. K. O'Dowd, H. Klassen (2003). Isolation and characterization of neural progenitor cells from post-mortem human cortex. *J Neurosci Res* **74**(6): 838-851.
- Seaberg, R. M., D. van der Kooy (2002). Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. *J Neurosci* **22**(5): 1784-1793.
- Sharov, A. A., S. Masui, L. V. Sharova, Y. Piao, K. Aiba, R. Matoba, L. Xin, H. Niwa, M. S. Ko (2008). Identification of Pou5f1, Sox2, and Nanog downstream target genes with statistical confidence by applying a novel algorithm to time course microarray and genome-wide chromatin immunoprecipitation data. *BMC Genomics* **9**: 269.
- Sicotte, N. L., K. C. Kern, B. S. Giesser, A. Arshanapalli, A. Schultz, M. Montag, H. Wang, S. Y. Bookheimer (2008). Regional hippocampal atrophy in multiple sclerosis. *Brain* **131**(Pt 4): 1134-1141.
- Sim, F. J., C. R. McClain, S. J. Schanz, T. L. Protack, M. S. Windrem, S. A. Goldman (2011). CD140a identifies a population of highly myelinogenic, migration-competent and efficiently engrafting human oligodendrocyte progenitor cells. *Nat Biotechnol* **29**(10): 934-941.
- Sinclair, A. H., P. Berta, M. S. Palmer, J. R. Hawkins, B. L. Griffiths, M. J. Smith, J. W. Foster, A. M. Frischauf, R. Lovell-Badge, P. N. Goodfellow (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* **346**(6281): 240-244.

- Sisodiya, S. M., N. K. Ragge, G. L. Cavalleri, A. Hever, B. Lorenz, A. Schneider, K. A. Williamson, J. M. Stevens, S. L. Free, P. J. Thompson, V. van Heyningen, D. R. Fitzpatrick (2006). Role of SOX2 mutations in human hippocampal malformations and epilepsy. *Epilepsia* **47**(3): 534-542.
- Skoff, R. P. (1990). Gliogenesis in rat optic nerve: astrocytes are generated in a single wave before oligodendrocytes. *Dev Biol* **139**(1): 149-168.
- Stallcup, W. B., L. Beasley (1987). Bipotential glial precursor cells of the optic nerve express the NG2 proteoglycan. *J Neurosci* **7**(9): 2737-2744.
- Sugiarto, S., A. I. Persson, E. G. Munoz, M. Waldburger, C. Lamagna, N. Andor, P. Hanecker, J. Ayers-Ringler, J. Phillips, J. Siu, D. A. Lim, S. Vandenberg, W. Stallcup, M. S. Berger, G. Bergers, W. A. Weiss, C. Petritsch (2011). Asymmetry-defective oligodendrocyte progenitors are glioma precursors. *Cancer Cell* **20**(3): 328-340.
- Tamaki, S., K. Eckert, D. He, R. Sutton, M. Doshe, G. Jain, R. Tushinski, M. Reitsma, B. Harris, A. Tsukamoto, F. Gage, I. Weissman, N. Uchida (2002). Engraftment of sorted/expanded human central nervous system stem cells from fetal brain. *J Neurosci Res* **69**(6): 976-986.
- Teng, Y. D., E. B. Lavik, X. Qu, K. I. Park, J. Ourednik, D. Zurakowski, R. Langer, E. Y. Snyder (2002). Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(5): 3024-3029.
- Tepavcevic, V., F. Lazarini, C. Alfaro-Cervello, C. Kerninon, K. Yoshikawa, J. M. Garcia-Verdugo, P. M. Lledo, B. Nait-Oumesmar, A. Baron-Van Evercooren (2011). Inflammation-induced subventricular zone dysfunction leads to olfactory deficits in a targeted mouse model of multiple sclerosis. *J Clin Invest* **121**(12): 4722-4734.
- Thier, M., B. Munst, S. Mielke, F. Edenhofer (2012). Cellular reprogramming employing recombinant sox2 protein. *Stem Cells Int* **2012**: 549846.
- Tripathi, R. B., L. E. Rivers, K. M. Young, F. Jamen, W. D. Richardson (2010). NG2 glia generate new oligodendrocytes but few astrocytes in a murine experimental autoimmune encephalomyelitis model of demyelinating disease. *J Neurosci* **30**(48): 16383-16390.
- Tsuchida, T., K. C. Parker, R. V. Turner, H. F. McFarland, J. E. Coligan, W. E. Biddison (1994). Autoreactive CD8+ T-cell responses to human myelin protein-derived peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(23): 10859-10863.
- Uchida, N., D. W. Buck, D. He, M. J. Reitsma, M. Masek, T. V. Phan, A. S. Tsukamoto, F. H. Gage, I. L. Weissman (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(26): 14720-14725.
- van den Berge, S. A., J. Middeldorp, C. E. Zhang, M. A. Curtis, B. W. Leonard, D. Mastroeni, P. Voorn, W. D. van de Berg, I. Huitinga, E. M. Hol (2010). Longterm quiescent cells in the aged human subventricular neurogenic system specifically express GFAP-delta. *Aging Cell* **9**(3): 313-326.
- van der Mei, I. A., A. L. Ponsonby, T. Dwyer, L. Blizzard, R. Simmons, B. V. Taylor, H. Butzkueven, T. Kilpatrick (2003). Past exposure to sun, skin phenotype, and risk of multiple sclerosis: case-control study. *BMJ* **327**(7410): 316.

- von Bohlen und Halbach, O. (2011). Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tissue Res* **345**(1): 1-19.
- Walton, N. M., B. M. Sutter, H. X. Chen, L. J. Chang, S. N. Roper, B. Scheffler, D. A. Steindler (2006). Derivation and large-scale expansion of multipotent astroglial neural progenitors from adult human brain. *Development* **133**(18): 3671-3681.
- Wang, C., F. Liu, Y. Y. Liu, C. H. Zhao, Y. You, L. Wang, J. Zhang, B. Wei, T. Ma, Q. Zhang, Y. Zhang, R. Chen, H. Song, Z. Yang (2011). Identification and characterization of neuroblasts in the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult human brain. *Cell Res* **21**(11): 1534-1550.
- Wang, S., D. Chandler-Militello, G. Lu, N. S. Roy, A. Zielke, R. Auvergne, N. Stanwood, D. Geschwind, G. Coppola, S. K. Nicolis, F. J. Sim, S. A. Goldman (2010a). Prospective identification, isolation, and profiling of a telomerase-expressing subpopulation of human neural stem cells, using sox2 enhancer-directed fluorescence-activated cell sorting. *J Neurosci* **30**(44): 14635-14648.
- Wang, Y., Y. Guan, F. Wang, A. Huang, S. Wang, Y. A. Zhang (2010b). Bmi-1 regulates self-renewal, proliferation and senescence of human fetal neural stem cells in vitro. *Neurosci Lett* **476**(2): 74-78.
- Wang, Z., E. Sugano, H. Isago, N. Murayama, M. Tamai, H. Tomita (2012). Notch signaling pathway regulates proliferation and differentiation of immortalized Muller cells under hypoxic conditions in vitro. *Neuroscience* **214**: 171-180.
- Watson, C. T., A. E. Para, M. R. Lincoln, S. V. Ramagopalan, S. M. Orton, K. M. Morrison, L. Handunnetthi, A. E. Handel, M. J. Chao, J. Morahan, A. D. Sadovnick, F. Breden, G. C. Ebers (2011). Revisiting the T-cell receptor alpha/delta locus and possible associations with multiple sclerosis. *Genes Immun* **12**(2): 59-66.
- Wilson, H. C., C. Onischke, C. S. Raine (2003). Human oligodendrocyte precursor cells in vitro: phenotypic analysis and differential response to growth factors. *Glia* **44**(2): 153-165.
- Willer, C. J., D. A. Dymant, N. J. Risch, A. D. Sadovnick, G. C. Ebers (2003). Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(22): 12877-12882.
- Windrem, M. S., M. C. Nunes, W. K. Rashbaum, T. H. Schwartz, R. A. Goodman, G. McKhann, 2nd, N. S. Roy, S. A. Goldman (2004). Fetal and adult human oligodendrocyte progenitor cell isolates myelinate the congenitally dysmyelinated brain. *Nat Med* **10**(1): 93-97.
- Windrem, M. S., N. S. Roy, J. Wang, M. Nunes, A. Benraiss, R. Goodman, G. M. McKhann, 2nd, S. A. Goldman (2002). Progenitor cells derived from the adult human subcortical white matter disperse and differentiate as oligodendrocytes within demyelinated lesions of the rat brain. *J Neurosci Res* **69**(6): 966-975.
- Wolswijk, G., M. Noble (1989). Identification of an adult-specific glial progenitor cell. *Development* **105**(2): 387-400.
- Wren, D., G. Wolswijk, M. Noble (1992). In vitro analysis of the origin and maintenance of O-2Adult progenitor cells. *J Cell Biol* **116**(1): 167-176.

- Yandava, B. D., L. L. Billingham, E. Y. Snyder (1999). "Global" cell replacement is feasible via neural stem cell transplantation: evidence from the dysmyelinated shiverer mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12): 7029-7034.
- Zappone, M. V., R. Galli, R. Catena, N. Meani, S. De Biasi, E. Mattei, C. Tiveron, A. L. Vescovi, R. Lovell-Badge, S. Ottolenghi, S. K. Nicolis (2000). Sox2 regulatory sequences direct expression of a (beta)-geo transgene to telencephalic neural stem cells and precursors of the mouse embryo, revealing regionalization of gene expression in CNS stem cells. *Development* **127**(11): 2367-2382.

ANEXO

(PUBLICACIONES)

IDENTIFICATION OF SOX2⁺ GLIAL PROGENITOR CELLS IN NORMAL ADULT HUMAN WHITE MATTER

Oliver-De La Cruz J^{1,2}, Carrión-Navarro J², Gutiérrez-Martín A⁴, Lázaro-Ibáñez E³, Escobedo-Lucea C³, Perona R⁵, López-Rios F⁶, Belda-Iniesta C², and Ayuso-Sacido A^{2,3}

¹. Gastrointestinal Cancer Clinical Research Unit. Spanish National Cancer Research Centre, Madrid, Spain

². Centro Integral Oncológico Clara Campal (CIOCC) and Instituto de Medicina Molecular Aplicada (IMMA). Hospital de Madrid Foundation, Madrid, Spain.

³. Division of Biopharmaceutics and Pharmacokinetics. University of Helsinki, Helsinki, Finland.

⁴. Neurosurgery Department, Hospital Universitario la Fe de Valencia, Valencia, Spain.

⁵. Instituto de Investigaciones Biomédicas CSIC/UAM. Madrid, Spain.

⁶. Laboratorio de Dianas Terapéuticas Therapeutic Targets Laboratory, University Hospital HM Sanchinarro, Madrid, Spain.

CORRESPONDING AUTHOR

Angel Ayuso-Sacido, PhD

Director of the Thoracic and Brain Tumor Laboratory

CIOCC and IMMA, Hospital de Madrid Foundation.

C/ Oña 10

28050, Madrid (Spain)

Tel: +34 91756 78 00 ext. 4603

e-mail: ayusosacido@gmail.com

ABSTRACT

A significant number of neurodegenerative diseases progress with a loss of myelin, which makes them candidate diseases for the development of cell-replacement therapies. The mobilization of endogenous neural/glial progenitor cells, together with their isolation, *in vitro* expansion and further implantation have been proposed as the most promising approaches. Adult neural stem cells (NSC) are located within the subventricular zone (SVZ) along the lateral ventricles and the subgranular zone (SGZ) in the hippocampus. Furthermore, a pool of glial progenitor cells is also present in the subcortical white matter of normal adult human brains. Cells expressing A2B5, PDGFR α /CNP have been isolated within this pool of cells, all of which demonstrate glial progenitor features. SOX2 expression is linked to the undifferentiated state of stem cells in mammalian neurogenic niches. In developmental stages, this marker is expressed earlier in the differentiation process to glial cells, and its expression has been reported in human fetal VZ and adult SVZ and SGZ. In the present study, we have identified a new subpopulation of glial progenitor cells from the white matter of the adult human temporal lobe. These cells are SOX2⁺, with no expression of the main microglial (Iba1), neuronal (NeuN) or oligodendroglial (CNPase) *in vivo* and are able to generate O4⁺ immature oligodendrocytes and, to a lesser extent, GFAP⁺ astrocytes *in vitro*.

INTRODUCTION

A significant number of neurodegenerative diseases that affect the central nervous system progress with loss of myelin. Within this group of diseases, multiple sclerosis (MS) is the most common cause of neurological disability in young adults^{1,2} and is a candidate disease for the development of cell therapies. The mobilization of endogenous neural/glial progenitor cells, together with the isolation of such a cells, *in vitro* expansion and implantation in the same patient within the most invalidate sclerotic plaques in the brain, might be the most promising approaches. This idea has been reinforced by the number of reports describing the existence of a pool of oligodendrocyte progenitor cells (OPCs)³⁻⁵ within the parenchyma of the adult human brain, which might be responsible for the spontaneous myelination observed in patients with MS⁶. Therefore, the identification and isolation of the various subpopulations within the OPC pool and the evaluation of their potential for generating oligodendrocytes *in vitro* will be essential for modulating their migration, differentiation and integration *in vivo* in the damaged brain area. Primary cell cultures represent an invaluable model for testing the responsiveness of OPCs to drugs and growth factors, as well as for accurately defining the differentiation processes that result in fully functional oligodendrocytes.

Various subpopulations of OPCs have been purified from adult human brain samples using A2B5, CNPase or PDGFR α ^{3-5,7,8} and expanded *in vitro*, at which point the OPCs demonstrated glial progenitor features. However, to our knowledge, the presence of a SOX2 (SRY-like homeobox 2) subpopulation, which precedes the expression of these markers during the differentiation process to glial cells, has not been reported. This transcription factor is a member of a family characterized by the presence of the homologous sequence HMG (high mobility group) box in their genes. It is a key factor for maintaining pluripotency and is required for the reprogramming of somatic cells in induced pluripotent cells (iPS)^{10,11}. Throughout development, SOX2 plays critical roles in self-renewal and cell fate decision during early embryogenesis^{12,13}, fetal development and neuroectoderm formation^{13,14}, and its expression is retained in adult neural stem cells¹³⁻¹⁸. In humans, SOX2⁺ cells are also present in the fetal ventricular zone¹⁹ and the

adult subventricular zone²⁰ (SVZ) and the subgranular layer²¹ (SGL) of the hippocampus.

The aim of this study was to identify new subpopulations of cells within the OPC pool that had the potential to generate mature oligodendrocytes, either *in vivo* or *in vitro*. First, we checked for the absence of histological abnormalities in tissue obtained from epilepsy surgery patients by performing histological studies, including automatized KI67 recount, and complemented with MRI analysis. We then improved the efficiency of the isolation protocol and the culture conditions, which enabled the identification of new cells within the OPC pool in the adult human white matter. Through the introduction of a sucrose gradient centrifugation step, we were able to isolate, for the first time, a SOX2⁺ cell subpopulation from adult human white matter, which expanded as sphere-floating clusters. These cells acted as glial progenitors *in vitro*, generating O4⁺ oligodendrocytes and GFAP⁺ astrocytes. Lastly, we found SOX2⁺ cells in the original tissue, which did not co-localize with the main microglial, neuronal or oligodendroglial markers, and only a small fraction of the cells were GFAP⁺.

RESULTS

Surgical samples of white matter from the anterior temporal lobe of epileptic patients do not display histopathological abnormalities.

Human temporal lobe samples were obtained from patients with mesial temporal sclerosis (age 17-55 [mean value: 38.53 ± 10.98] years) undergoing surgical resection at the Department of Neurosurgery, Hospital La Fe (Valencia, Spain). Informed consent was obtained for all patients before the surgery, as approved by the ethics board. Anterior regions of the temporal lobe were chosen to their remoteness to the epileptic focus, the hippocampus.

As a first approach and to determine the absence of abnormalities in the surgical brain tissue used for our study, the region of white matter from the anterior temporal lobe used in this study was compared with contralateral areas from the same patient using diffusion-tensor images (**Figure 1a-b**) from the pre-surgical study. Fractional anisotropy (FA), a scalar value that measures the directionality of water molecules and can therefore be correlated with the integrity of white matter tracts, showed similar values between the affected and the contralateral white matter. Analogous results were obtained with the mean apparent diffusion coefficient (ADC).

A histopathological analysis was then performed in the temporal lobe after removal. The tissue samples displayed normal cytoarchitecture or mild gliosis and showed no evidence of the alterations that had been described in mesial sclerosis, including diffuse cortical architectural disorganization of the cortex, neuronal heterotopia within white matter or microglia activation (**Figure 1c-e**). Additionally, KI67 recounts revealed a number of cells in active cycle considered normal, thereby ruling out the presence of neoplastic proliferation (**Figure 1F-I**).

Implementation of the neural stem/progenitor cell isolation protocol

Experiments were initially performed according to the stem/progenitor cell purification protocol used extensively for both adult human white matter and adult human neurogenic niches within the SVZ and SGZ^{9,22,23}. The cells were seeded on uncoated plastic dishes in defined medium supplemented with bFGF and EGF.

Using this procedure, only 4 of the 14 samples resulted in viable cultures (a 28.57% success rate). Dissociated cells generated adherent colonies that could be expanded as a monolayer, with fibroblast-like morphology, for a minimum of 7 passages. Cells suffered a decreasing proliferation rate through subsequent passages until they became quiescent, accompanied by morphological alterations in the initial bipolar morphology, such as an increased cytoplasm/nucleus ratio and the presence of nuclear invaginations.

To improve the efficiency of the isolation protocol and the culture conditions that allow for the possible identification of new cells within the OPC pool in adult human white matter, we introduced a final step consisting of a sucrose gradient, as described in Johansson *et al.*, 1999²⁴. Briefly, dissociated cells were resuspended in 0.9 M sucrose in 0.5x HBSS w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ and centrifuged at 750g for 10 min. This procedure helps to remove myelin and cell debris generated during mechanical disaggregation that might interfere with OPC isolation (**Figure 2**).

As a result, viable cultures were obtained from all samples processed (10 out of 10). Nevertheless, this modification led to the purification of a different cell type with a smaller size, which expanded forming sphere-like colonies. Thus, the sucrose gradient was acting more as an enrichment method based on cell density than just a washing step. In the initial culture, all proliferating cells started to generate clusters that eventually formed floating or lightly adhered spheres (**Figure 2A-B**). The spheres could be passaged using mechanical disaggregation for at least two subcultures (tertiary spheres), but both their number and size decreased through successive passages. This fact, together with the need for a seeding concentration of at least 3000 cell/cm² for survival, points to a limited self-renewal.

These neurosphere-like clusters were also able to generate a monolayer culture in each passage, which adhered to the culture plate, with morphological features similar to those obtained with the standard protocol. These cells could be isolated and propagated separately for no fewer than 5 passages (**Figure 2C-D**).

SOX2 expression is restricted to sphere-forming cells

To determine the phenotype of the isolated cells and the impact of the sucrose gradient in the cell type obtained, three cells lines from each type of culture were used to perform a molecular characterization by PCR, using a set of primers designed to detect

stemness-related molecular markers and differentiation towards each neural lineage (**Supplementary Table 1**).

The analysis revealed different expression patterns for stem cell genes among the three cell types (**Figure 2E**), whereas expression in each cell type was almost equivalent among the samples (**Supplementary Figure 2**). While both adherent cultures showed a very similar profile, sphere-forming cells differed in the absence of *ABCG2*, *MSI1* and *PAX6*, the presence of *CD133* in all samples and, above all, a higher expression of *SOX2*.

This enrichment in *SOX2* was confirmed by QRT-PCR. Relative levels of *SOX2* were more than 100-fold higher in neurospheres than in the original adherent culture, and approximately 10-fold higher than in adherent cultures derived from each sphere line (**Figure 2 F**).

Moreover, immunocytochemistry revealed that *SOX2* protein could be detected exclusively in neurospheres (**Figure 2G-J, Supplementary Figure 3**). Seven days after isolation, $43.69\% \pm 8.92\%$ of the cells were *SOX2*⁺, whereas after the first passage the percentage of *SOX2*⁺ cells increased to $80.57\% \pm 17.20\%$. Co-immunostaining with Ki67 showed that $17.45\% \pm 5.80\%$ of the cells in the neurospheres were Ki67⁺, with all of these cells *SOX2*⁺.

To determine whether adherent cells that originated from neurospheres were able to recover the neurosphere phenotype, the cells were seeded at 3000 cells/cm² in ultra-low attachment culture plates, with or without 100 μ M of β -mercaptoethanol, an inhibitor of cell-to-cell contact (Kukekov et al., 1997²⁵). Although a number of the cells survived and formed small cell aggregates under both conditions, *SOX2* expression was not recovered, and the cells degenerated and eventually died after two weeks.

***SOX2*⁺ cells are glial progenitor cells**

The molecular analysis also demonstrated that this *SOX2* enrichment coincided with changes in the expression of glial genes (**Figure 3A**). In addition to *NG2* and *PDGFR α* , the neurospheres expressed a higher number of both earlier and differentiated oligodendrocyte markers, including the transcription factors *OLIG1* and *OLIG2*, which are necessary for oligodendrocyte differentiation, and *MAG*, *PLP* and *MBP*, all of which are myelin-specific genes.

The presence of A2B5 and O4 (earlier oligodendrocyte markers) was also confirmed by immunocytochemistry in initial cultures (**Supplementary Figure 4**). However, these markers were undetectable in the other cell types. Nevertheless, the vast majority of cells were A2B5⁻, indicating that SOX2⁺ cells do not correspond to the previously described A2B5⁺ population.

To examine their spontaneous differentiation in media containing growth factors, spheres were seeded onto Matrigel-coated coverslips and left to grow for 14 days. During this time, cell processes started to arise from the neurosphere, and the spheres slowed their growth, suggesting that the attachment was limiting cell proliferation. When immunostaining was performed (**Figure 3B-G**), a decrease in SOX2⁺ cell number was observed (45.38% \pm 20%). All spheres were positive for the surface marker O4, one of the earliest antigens expressed in cells committed to the oligodendroglial lineage (pre-oligodendrocytes). Therefore, cell processes correspond to these small O4⁺ cells (58.35% \pm 21.11%), with 46.92% \pm 24.73% of them SOX2⁺/O4⁺ (26.72% \pm 14.25% of the total number of cells).

We also found GFAP⁺ cells (10.01% \pm 3.06%), all of which showed higher SOX2⁺ immunoreactivity. In general, these astrocytes were large, flattened and expanded cells, with a larger nucleus, and tended to exit from the sphere core. Lastly, no MAP2⁺ neuronal/neuroblast cells were observed. Therefore, SOX2⁺ cells from adult white matter can be considered as glial progenitor cells and are able to generate O4⁺ immature oligodendrocytes and, to a lesser extent, GFAP⁺ astrocytes.

SOX2⁺ cells are present in adult human white matter

After the discovery of this SOX2⁺ cell subpopulation, we analyzed four tissue samples of adult human white matter from the temporal lobe. Tissues were fixed for 48 hours in 4% PFA, cryoprotected and cut into 12- μ m sections with cryostat. SOX2 immunostaining was performed using antigen retrieval. Highly expressing SOX2 human glioblastoma sections were used as a positive control (see **Supplementary Figure 7**). We detected the presence of SOX2⁺ cells in all samples analyzed. The cells rarely appeared and were scattered throughout the white matter, although at times concentrated in small areas. Their number was similar among the samples, representing approximately 2.01 \pm 0.73% of the total number of cells.

Co-immunostaining with neuronal and glial markers was performed to determine the SOX2⁺ cells phenotype. Co-staining with Iba-1 was negative (**Figure 4A-D**), ruling out their microglial identity. Similarly, co-stain with CNPase (**Figure 2E-H**) or NeuN (**Figure 4I-L**) was negative, which supports the idea that the SOX2⁺ cell subpopulation does not correspond to a differentiated oligodendroglial or neuronal population. However, GFAP immunohistochemistry revealed a low proportion of co-immunolocalization with SOX2⁺ cells. Although it is certainly difficult to give an estimated ratio because of the high GFAP immunoreactivity within the white matter, the number of GFAP⁻ SOX2⁺ cells (**Figure 4M-P**) was always higher than the number of GFAP⁺ SOX2⁺ cells (**Figure 4Q-T**), and the presence of both populations was ensured in all samples.

DISCUSSION

In this report, we describe for the first time the isolation of an SOX2⁺ glial progenitor cell subpopulation from adult human white matter. These cells, which originate from the OPC pool, differed in their manner of expansion as neurosphere-like clusters, as well as in their higher expression of glial progenitor markers, with the ability to generate astrocytes and oligodendrocytes. Moreover, this small population of SOX2⁺ cells was also present in the original tissue and, in general, did not co-stain with any differentiated markers of the three main neuronal lineages or microglia.

We have successfully improved the standard procedure to allow for the identification of the new cell subpopulation within the OPC pool in adult human brains. We have introduced a small but significant step in the described and widely used protocol^{9,22,23}. Although it is described as an easy step for reducing myelin debris and enhancing cell survival²⁴, centrifugation in a sucrose solution resulted in both a higher success rate for viable cell isolation and enrichment in the SOX2⁺ cell subpopulation, which expanded as neurospheres. Centrifugation in a sucrose solution is a quick, simple and inexpensive procedure and does not require special equipment or reagents, unlike fluorescently activated cell sorting (FACS) technology^{5,7,9}. Moreover, it does not require the introduction of genomic constructions, unlike adenoviral transfection necessary for the purification according to an intracellular marker expression^{9,19}. The most likely mechanism of action is selection based on buoyant density, which is not a new issue in stem cell isolation²⁶⁻²⁸. This methodology consists of the distribution of cells according to their density after centrifugation in specific solvents that generate density gradients. The most frequently used solvent, Percoll, enabled us to isolate an SOX2⁺ population from adult rat SVZ with similar characteristics to our cells²⁶.

SOX2 protein is involved in neural stem cell phenotype maintenance, proliferation and subsequent differentiation. Adult animals with reduced SOX2 expression showed a significant reduction in the number of stem cells in neurogenic niches²⁹, although a number of other SOXB family members can rescue a portion of these cells. In our *in vitro* studies, only the SOX2⁺ cell subpopulation was able to generate neurosphere-like clusters, a culture system commonly associated with neural stemness. Similarly, SOX2 expression is necessary for the formation of neurospheres from adult human spinal cord³⁰, human fetal ventricular zone¹⁹ and rodent tissue^{13,15}. Furthermore, SOX2

induction is sufficient to transform human astrocytes into NSC-forming sphere-like colonies³¹.

Nevertheless, sphere cultures are not exclusive to the neural stem cell phenotype, given that oligodendrocyte progenitors can also generate floating cell aggregates, known as oligospheres^{32,33}. Immunostaining revealed the presence of both glial populations, oligodendroglial and astroglial cells in the same sphere, but an absence of MAP2⁺ cells, indicating a bilineage competence, which is similar to that repeatedly established for previously described glial progenitors. This enrichment of glial genes in SOX2⁺ cells has been also found in fetal tissue¹⁹ and adult SVZ²⁰, where SOX2 expression has been associated with glial fate. However, SOX2⁺ cells have also been found to generate neurons under the appropriate conditions^{13,19}. Therefore, we cannot discard the possibility that under specific culture conditions, our cells might behave as true neural stem cells *in vitro* and not just as glial progenitors, as initially described when an A2B5 population was isolated (ref). SOX2 expression has also been related to a lower self-renewal *in vitro* in adult cells, a characteristic of progenitor cells. We were unable to expand SOX2⁺ cells for more than 3 passages, which, at first glance, might limit their use in cell replacement therapies. However, the presence of SOX2 in these cells and the recent success of using protein transduction technology to directly deliver c-Myc, Sox2, Oct3/4 and/or Klf-4 to mammalian cells for cellular reprogramming by modifying them with so-called cell-penetrating peptides (CPPs) or protein transduction domains (PTDs) (Thier et al., 2012) might help in the future to expand the SOX2⁺ progenitor cells *in vitro* before transplantation into the sclerotic plaques.

Little is known about the mechanism by which SOX2 controls antagonist cellular processes such as self-renewal and differentiation in adult neural stem cells. For example, genetic studies^{34,35} have found functional SOX2 regulatory sequences in two SOXD family members, SOX5 and SOX6, which interfere with the SOXE group that promotes oligodendrocyte differentiation. SOX2 also acts as an SOX11 activator, a transcription factor expressed in earlier oligodendrocyte progenitor commitment and lost after full differentiation. Other genes related to oligodendrocyte differentiation, such as PDGFR α , Olig2, and NG2, have been found to respond directly to SOX2 variations. According to the literature, this same duality is reflected in the cell signaling system more associated with SOX2 expression, the Notch molecular pathway^{36,37}. Additionally, various factors have been recently reported as modulating the biology of

these SOX2⁺ cells and may be useful when attempting to develop protocols that allow for either the expansion of these cells *in vitro* or the modulation of their behavior *in vivo*. In this regard, miR-378 plays a role in cell self-renewal by enhancing SOX2 expression through the suppression of vimentin levels in the U87 human cell line (Deng et al., 2012). The inhibition of p57kip2 in NSCs from rat spinal cords leads to a decrease in astroglia and an increase in oligodendroglia (Jadesz et al., 2012). The inhibition of specific class I histone deacetylase (HDAC) blocked oligodendrocyte differentiation, morphological maturation and myelin gene expression in human adult OPCs (Conway et al., 2012).

We have also been able to identify SOX2⁺ cells in normal adult white matter because, unlike other markers defined for glial progenitors in tissue, SOX2⁺ cells can be easily detected by immunohistochemistry. Previous studies focusing on neoplastic or epileptic pathologies^{38,39} have shown that SOX2⁺ cells were present in temporal cortex obtained from normal postmortem tissue, but in what they considered to be negligible amounts. One of these analyses found a slight increase in SOX2⁺ cells in temporal mesial sclerosis, although it was not statistically significant in contrast to recounts performed in other epileptic pathologies such as type II focal cortical dysplasia or polyhydramnios, megalencephaly and symptomatic epilepsy (PMSE) syndrome.

During the characterization of the SOX2⁺ cells, no co-immunolocalization with neuronal or oligodendroglial markers was found, and only a small fraction of GFAP⁺ cells were discovered. This finding contrasts with the distribution reported in mice and rats^{15,16} where virtually all SOX2⁺ cells scattered across the cortex corresponded to GFAP⁺ astrocytes. In our study tissue, SOX2⁺/GFAP⁺ might represent a reactive glia population due to epileptic injury, a factor that has been shown sufficient for reactivating SOX2 expression in quiescent astrocytes⁴⁰. This phenomenon might explain the slight increase in SOX2⁺ cells in mesial sclerosis. Thus, we may have a similar situation to that observed when oligodendrocyte progenitor cells were first described in human white matter, where a small percentage of these cells were GFAP⁺ in epileptic samples; however, this phenotype was absent in normal tissue⁵.

Therefore, according to their immunophenotype in the tissue, the behavior of their *in vitro* counterparts, and the previous progenitor cells found in this tissue, our data suggest that this SOX2 population may represent a glial progenitor source within the

adult human brain parenchyma. The discovery of this new type of progenitor cell opens the possibility for designing cellular therapy strategies directed towards mobilizing these cells towards damaged areas to accomplish a functional cell replacement. Our isolated cells offer an *in vitro* model for further characterization of their proliferative signal response and differentiation potential in order to modulate their activity *in vivo*.

Finally, the discovery of this population may also be relevant in the search for glioma-initiating cells. The origin of glial tumors is still unknown, and attempts to correlate it with SVZ stem cells have failed⁴¹. In contrast, there is increasing evidence suggesting that these cells share numerous characteristics with glial progenitors⁴²⁻⁴⁴. On the other hand, previous studies on glioblastoma have shown that SOX2 is variably overexpressed in tumor tissue^{39,45,46}, and SOX2⁺ cells act *in vitro* as cancer-initiating cells, losing their tumorigenic capacity after their silencing⁴⁷. In this study, we describe a cell population that meets both criteria and is therefore a serious candidate for consideration in future research on gliomagenesis.

MATERIAL AND METHODS

Samples and cell isolation protocol

Twenty adult human white matter samples of normal appearance were obtained from planned resections during anterior temporal lobectomy for the treatment of intractable epilepsy. The procedures were conducted at Hospital La Fe (Valencia, Spain) and were performed with informed patient consent and in accordance with the medical and science ethics board.

All samples were processed within 12 hours of extraction, following the protocol described by Ayuso-Sacido *et al.* (2008)²². Briefly, white matter was macroscopically separated from temporal tissue, minced and washed in HBSS (Hanks balanced salt solution) w/o Ca^{2+} Mg^{2+} . Enzymatic digestion was sequentially performed with Solution I (Papain (14 U/ml, Sigma) and DNase I (10 U/ml, Sigma) in PIPES solution) for 90 min at 37°C and Solution II (Papain (7 U/ml) and DNase I (15 U/ml) in PIPES: proliferative media (1:1)) for 30 min at 37°C. Cells were then dissociated using diameter-decreasing polished Pasteur pipettes and filtered through a 70- μm mesh. Fetal bovine serum (10%, Invitrogen) was added to stop enzymatic digestion.

To improve the isolation success rate in the remaining samples, a final washing step was added to remove myelin and cell debris²⁴. Dissociates were resuspended in 0.9 M sucrose in 0.5x HBSS w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ and centrifuged at 750g for 10 min, as described previously (9).

Histopathological analysis of human samples

DTI Analysis: Sequence: Single shot spin EPI (TR/TE = 10.100/102, FoV = 250 mm, in-plane resolution of 2×2 mm and a slice thickness of 2.0 mm, average = 2, 128×128 matrix, 70 contiguous axial slices, voxel: $1.95 \times 1.95 \times 2$ mm). The images were acquired in 30 non-collinear directions ($b=1000 \text{ s/mm}^2$) and one acquisition without diffusion encoding ($b=0 \text{ s/mm}^2$). Software: DTV.II SR toolbox, Image Computing and Analysis Laboratory (UTRAD/ICAL) Department of Radiology, The University of Tokyo Hospital, extension of Volume 1, package (<http://www.volume-one.org/>).

Method of DTI Analysis: Degree of sensitivity for generating DTI tracts: FA=0.05, steps=160; ADC (x1K): any; So <80; Angle: any; Size and Orientation of ROI

KI67 immunostaining: KI67 immunohistochemistry was performed on a benchmark ULTRA using clone 30-9 (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ), and interpreted with an iScan Coreo and Virtuoso algorithm (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). A histopathological analysis of tissue samples was performed to validate their use in the rest of the study. Architectural disorganization of the cortex and neuronal heterotopia were studied using NeuN immunostaining. Microglia activation was examined by Iba-1 marking. Experiments were performed using the same protocols described later.

Cell Culture

Dissociated cells were resuspended in defined proliferative media composed of DMEM-F12, non-essential amino acids (100 μ M), HEPES (2 mM), D-glucose (30 mM), bovine serum albumin (0.001%), sodium pyruvate (1 mM), L-glutamine (2 mM), N2 supplement (1X) and penicillin-streptomycin-fungizone (1X), all of which were acquired from Gibco-Invitrogen. The media also included hydrocortisone (300 ng/ml) and triiodothyronine (30 ng/ml), which were acquired from Sigma. The media was supplemented with bFGF (basic fibroblast growth factor) (10 ng/ml, Sigma) and EGF (epidermal growth factor) (10 ng/ml, Sigma). The media was replaced every 2 days.

Four viable cell cultures were obtained from the original protocol and six cell lines from the modified protocol.

When the cells growing in the monolayer adherent culture reached a confluence nearing 90%, a subculture was performed using *Triple Express*® (Invitrogen) for 5 min at 37°C. Cells were reseeded at a density of 2000 cells/cm² in 25-cm² culture flasks. With this procedure, all cell lines could be expanded for at least 7 passages.

Sphere-like clusters obtained using the improved protocol were passaged before becoming necrotic by mechanical disaggregation with polished Pasteur pipettes, and planted at 3000 cells/cm² on 24-well plates. All cell lines could give rise to tertiary neurospheres. Additionally, adherent culture colonies derived from neurosphere cultures were subcultured separately according to the monolayer culture protocol and were able to reach a minimum of 5 passages.

To test whether the adherent cells produced by spheres were able to regenerate neurospheres, the cells corresponding to 3 samples were seeded on ultra-low attachment, 6-well culture plates (REF) and maintained in culture in growing media

under two different conditions, adding or not 6- μ M β -mercaptoethanol (Sigma), as described²⁵. Viability was studied using Calcein/I Propidium iodide. After 2 weeks, the cells were seeded on Matrigel-coated coverslips, cultured for 24 hours and then fixed.

Finally, to determine the spontaneous differentiation of sphere-forming cells, the cells were seeded after disaggregation at 3000 cells/cm² in Matrigel-treated coverslips and cultured for 14 days in media with growth factors prior to fixation in 4% PFA for 20 min.

RT-PCR and QRT-PCR

Total RNA was extracted from 3 cell lines of each culture type in passage 2 (neurospheres) or passage 3 (adherent cultures) using RNeasyTM, followed by DNase I treatment, both according to manufacturers' specifications (Quiagen). cDNA was synthesized using a High Capacity cDNA Reverse Transcription KitTM (Applied BiosystemsTM). The cDNA quality and the absence of DNA genomic contamination was assured by PCR (Paq5000 DNA Polymerase, StratageneTM) using a housekeeping gene primer (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH).

A set of primers for stem cell markers and markers for each neural lineage were designed using Primer 3 software (see **Supplementary Table 1**). After ensuring their efficiency, molecular analyses were performed by PCR amplification followed by electrophoresis in 1.8% agarose gel. Positive and negative controls were used for each marker according to the literature.

SYBR Green-based QRT-PCR (Applied Biosystems) was run in a LightCycler 480 Instrument (Roche). For each experiment, controls were performed in which reverse transcriptase was omitted from the cDNA reaction mixture and template DNA was omitted from the PCR mixture. The amount of *SOX2* cDNA was normalized to the quantity of 3 housekeeping genes (β -actin, β -2-microglobulin and GAPDH) transcripts

Immunocytochemistry

Cells were plated for 24 h on MatrigelTM (BD Biosciences) treated coverslips, fixed with 4% paraformaldehyde (Panreac) for 20 min and washed with DPBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺ (Dulbecco's phosphate-buffered saline, Invitrogen). For Ki67 immunostaining, antigen retrieval was performed by exposing coverslips to boiling 10-

mM sodium citrate, 0.05% Tween 20, pH 6.0 for 15 minutes. The cells were blocked with 10% donkey serum (Jackson Immunoresearch) and 0.1% Triton X-100 (Sigma) for 45 min. Goat anti-human SOX2 antibody (1:50, Chemicon), mouse anti-GFAP (1:500, Dako) and mouse anti-human KI67 antibodies (DaKo, 1:250) were applied for 1 h at 25°C in blocking solution. After washing, secondary antibodies (Texas Red Donkey anti-goat antibody, 1:150; DyLight Donkey anti-mouse, 1:400 (Jackson Immunoresearch)) were applied for 1 hour in DPBS. The same procedure was performed for U373 cells as a positive control.

A2B5 and O4 immunostaining was performed using live cells. Cells were washed, blocked with 10% FBS 1% BSA and incubated in primary antibody (A2B5 clone 105 hybridoma supernatant (ATCC, 1:1); anti O4 (Millipore, 1:50)) for 1h. After washing, secondary antibody (488 goat anti-mouse, 1:500) was applied for 1h at 37°C. The cells were then fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min.

Finally, for all cases, the cells were washed, counterstained with DAPI and mounted with FluorSave[™] (Molecular Probes, Invitrogen).

Images were collected with a Leica TCS SP2 AOBS (Leica Microsystems) inverted laser scanning confocal microscope. All confocal images were obtained under identical scan settings. Eight-bit, 1024x1024-pixel images were collected for each preparation. Best focus was based on highest pixel intensity. Imaging conditions were identical for all images. Images were equally processed using MetaMorph® Software (Molecular Devices).

For the cell recount, at least 10 different pictures (including at least 5 neurospheres, depending on their size) from 3 different experiments were counted.

Immunohistochemistry

Sections from four temporal lobe samples were fixed with 4% PFA for 36 h. After washing, the sections were cryoprotected in a 30% sucrose solution overnight and cryosectioned at 14 µm. High-expressing SOX2 glioblastoma multiforme tissue was used as the positive controls. Sections were washed with PBS (0.1 M), and antigen retrieval was performed by immersing the sample in 10-mM sodium citrate, 0.05% Tween 20, pH 6.0 at 95-100°C for 1h. After permeabilization treatment with 0.2% Triton X-100 in PBS for 45 min, auto fluorescence was partially blocked using Sudan

black staining. Sections were incubated overnight at 4°C with goat anti-human SOX2 (1:25 in PBS; Chemicon), alone or in combination with mouse anti-Ki67 (1:250, Dako), mouse anti-GFAP (1:200, Abcam), mouse anti-NeuN (1:800), rabbit anti-Iba-1 (1:200, Wako), or mouse anti-CNPase (1:200, Sigma). Samples were then washed and labeled with appropriate secondary antibodies (Texas Red-conjugated Donkey anti-goat antibody (1:150) and DyLight-conjugated Donkey anti-mouse antibody (1:400), both from Jackson ImmunoResearch; Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-rabbit antibody (1:500, Molecular Probes)) for 1h at room temperature. After washing, nuclei were counterstained with DAPI and sections were mounted with FluorSave™ (Molecular Probes, Invitrogen).

Images were collected with an Olympus FW-100 (Olympus) inverted laser scanning confocal microscope. All confocal images were obtained under identical scan settings. Eight-bit, 1024x1024-pixel images were collected for each preparation. Best focus was based on highest pixel intensity. Imaging conditions were identical for all images. Images were equally processed using FluorView™ FV1000 (Olympus).

Statistical analysis

Data presented in this article represent mean \pm standard deviation and were calculated using SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, IBM). A statistical analysis to compare SOX2 mRNA levels was performed using a Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney comparisons with post hoc Bonferroni correction.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are especially grateful to the Department of Neurosurgery at Hospital La Fe (Valencia) and HM Hospital (Madrid). Jorge Oliver De La Cruz is a recipient of a predoctoral fellowship from the FPU program (AP2008/02823), Ministry of Education , Spain. This work was supported in part by grants from the Alicia Koplowitz Foundation (AAS, JOC), the Gent x Gent Foundation (AAS) and Health Research Fund (*Fondo de Investigaciones Sanitarias*, FIS) from the Carlos III Health Institute (PI10/01069)(AAS).

FIGURE LEGENDS

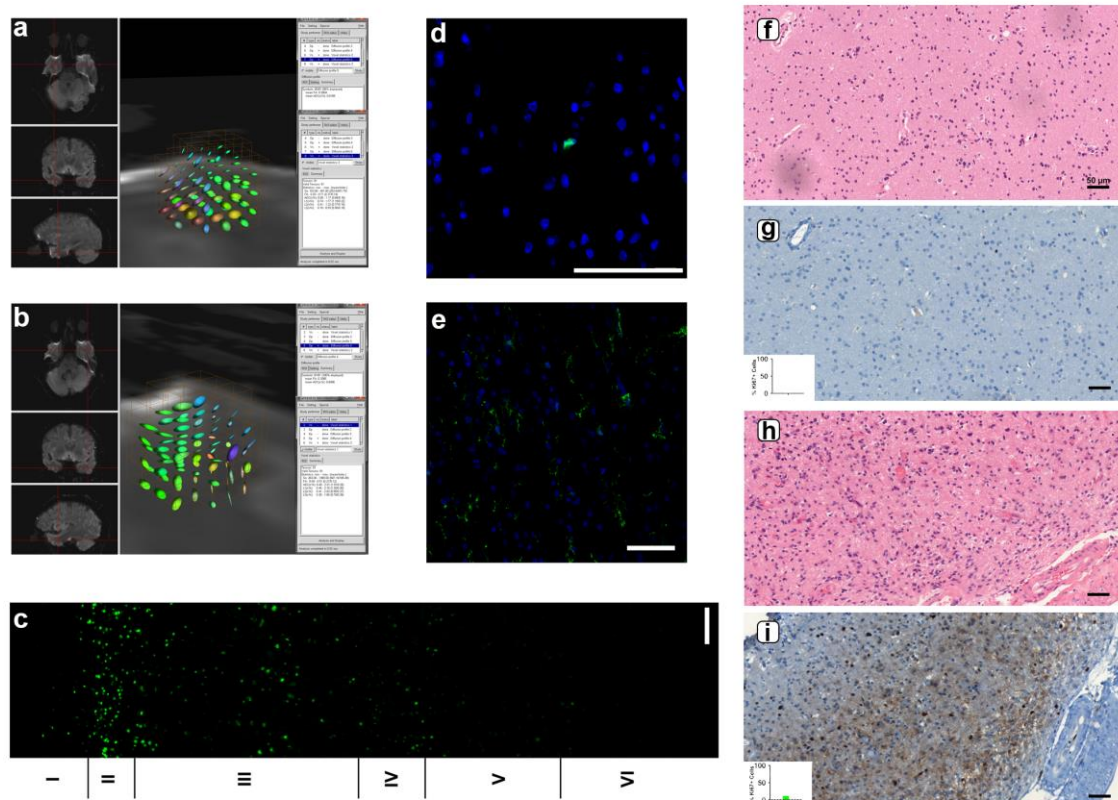


Figure 1: Analysis of white matter tissue obtained from epileptic patients a-b. Example of MRI analysis performed with DTV.II SR toolbox software. Diffusor tensors voxels were chosen according to the areas corresponding to tissue samples managed in the subsequent experiments (a) and used to calculate the AF and ADC statistics (mean, standard deviation, maximum and minimum values). The same number of voxels was situated in an equivalent area of the contralateral side (b) for comparison. (c). NeuN immunostaining did not reveal cortical disorganization. Roman numbers show the layer number. The scale bar represents 50 μm . (d) No neuronal heterotopia was observed within the white matter (NeuN Immunostaining). Only a smaller number of neurons appeared scattered throughout the white matter parenchyma. The scale bar represents 100 μm . (e) Iba-1 Immunostaining does not show microglia activation; microglial cells appeared with long branching processes and small cellular bodies. The scale bar represents 100 μm . (f-i) Ki67 recounts were performed using immunohistochemistry, and interpretation was carried out using a fully automated digital algorithm. The picture show an example of a white matter sample and a glioma control stained with hematoxylin-eosin (f and h, respectively) and Ki67 immunostaining (g and i, respectively). Scale bars represent 50 μm .

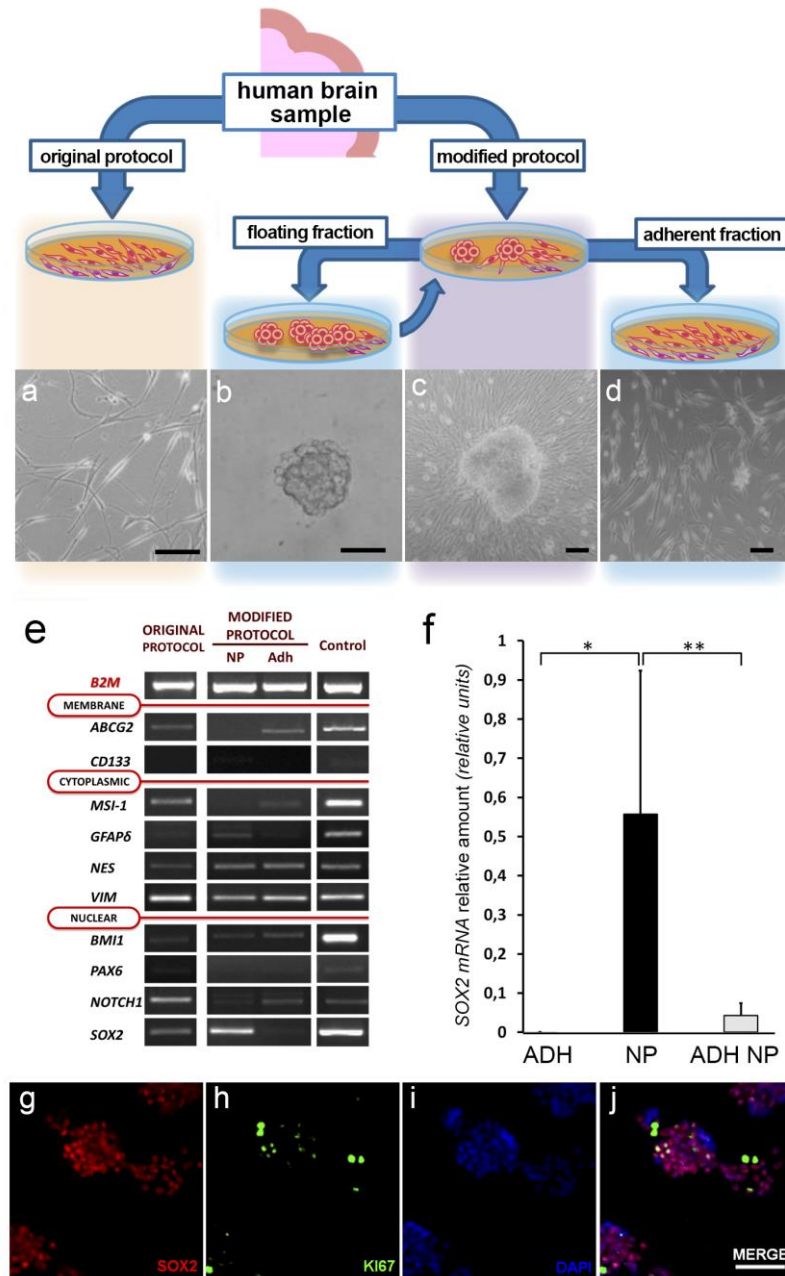


Figure 2: Progenitor cells can be isolated from adult human white matter. The original protocol resulted in a monolayer culture (a), whereas the modified protocol produced sphere-like colonies (b), which generated an adherent culture (c) that could be passaged separately (d). Scale bars represent 10 μ m. (e) Molecular characterization by PCR of stem cell markers was performed for the three types of cell lines. Primers, band size and positive controls can be seen in Supplementary Figure 1. PCR results for all samples considered can be seen in Supplementary Figure 2. (f) qPCR revealed that neurospheres (NP) express SOX2 ($0.557590283 \pm 0.366389743$) more than 1000 times as much as cells from the original protocol (ADH) ($0.000453344 \pm 0.000225462$) (*P-value= $0.0068 < \alpha = 0.05$) and approximately 10 times more than the adherent culture derived from the neurospheres (ADH NP) ($0.042446222 \pm 0.031808723$) (**P-value: $0.0091 < \alpha = 0.05$). Statistical analysis was performed with the Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney comparisons with post hoc Bonferroni correction. Data represents mean \pm standard error. (g-j) Immunohistochemistry for SOX2 and Ki67. SOX2 protein could only be detected in neurospheres. All Ki67+ cells co-stain with SOX2. Scale bar represents 20 μ m. Immunostaining for the rest of the cell types can be seen in Supplementary Figure 3.

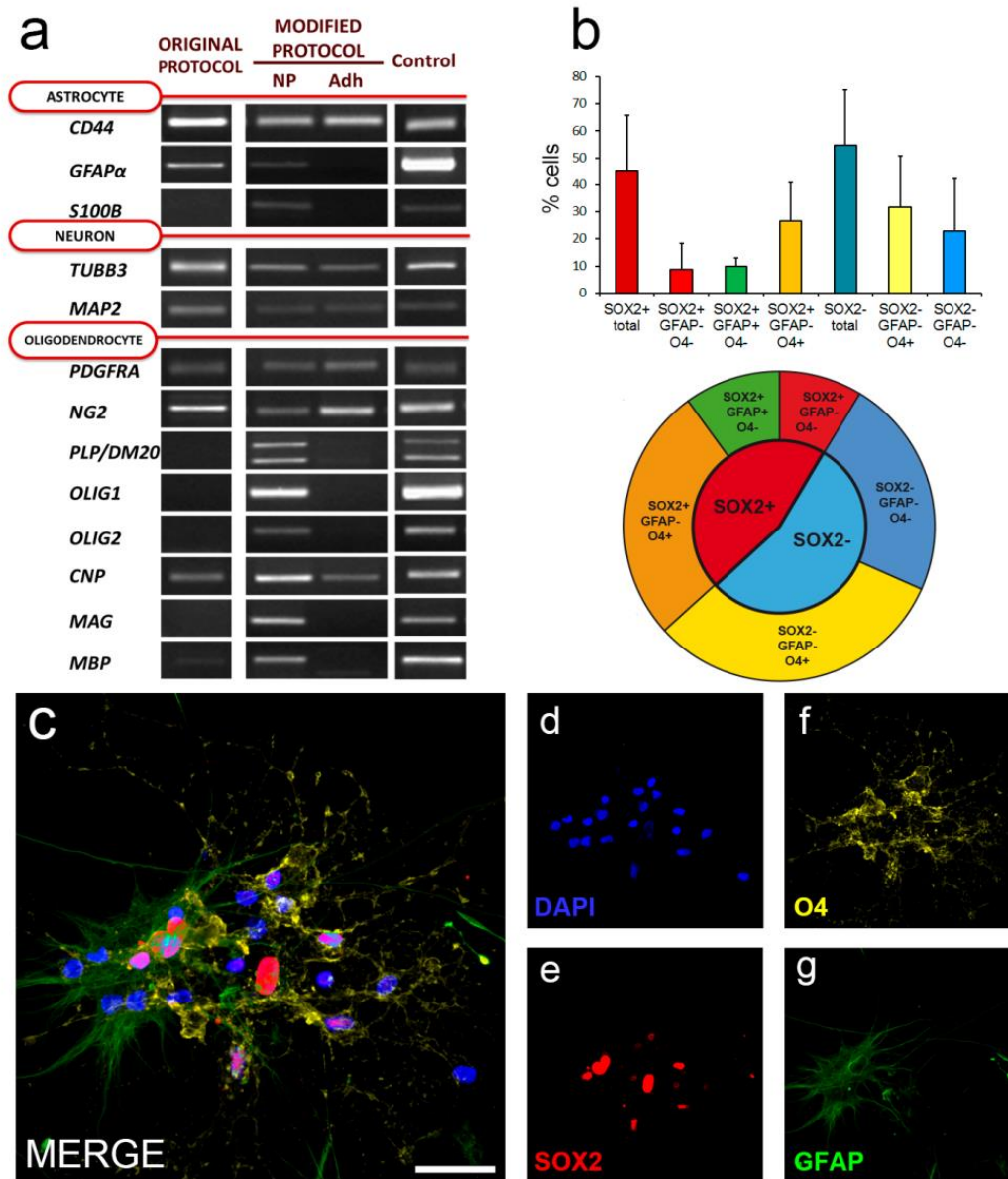


Figure 3: a) Sphere-forming cells (NP) express a higher number of oligodendrocyte markers than both adherent cultures (the original culture and the culture derived from spheres) in the molecular characterization by PCR. (b) The percentages showing the cell distribution within a sphere when the cells are seeded on Matrigel and maintained for 14 days. Bars represent mean \pm standard error. (c-g) Immunohistochemistry for SOX2, GFAP and O4 of these cells. Scale bar represents 25 μ m.

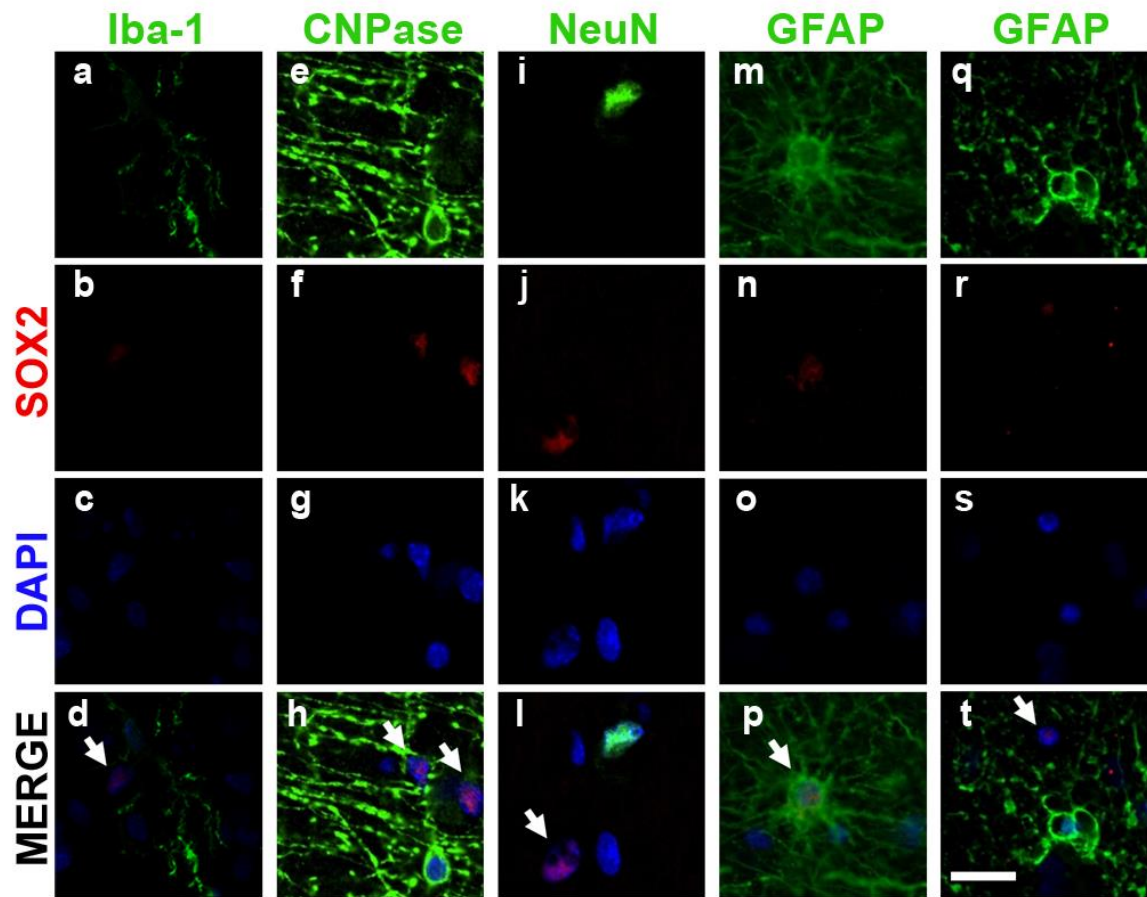


Figure 4: Immunohistochemical characterization of SOX2+ cells from adult temporal lobe white matter. No co-immunolocalization was detected for Iba-1 (a-d), CNPase (e-h) or NeuN (i-l). A number of the SOX2+ cells were GFAP + cells (m-p), but not all cells (q-t). Arrows indicate SOX2+ cells. Scale bar represents 20 μ m. The results of the immunostaining for glioblastoma sections, which were used as positive controls, are shown in Supplementary Figure 5.

BIBLIOGRAPHY

1. Koch-Henriksen, N. & Sorensen, P.S. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol* 9, 520-32 (2010).
2. Pflieger, C.C., Flachs, E.M. & Koch-Henriksen, N. Social consequences of multiple sclerosis: clinical and demographic predictors - a historical prospective cohort study. *Eur J Neurol* 17, 1346-51 (2010).
3. Roy, N.S. *et al.* Identification, isolation, and promoter-defined separation of mitotic oligodendrocyte progenitor cells from the adult human subcortical white matter. *J Neurosci* 19, 9986-95 (1999).
4. Scolding, N. *et al.* Oligodendrocyte progenitors are present in the normal adult human CNS and in the lesions of multiple sclerosis. *Brain* 121 (Pt 12), 2221-8 (1998).
5. Scolding, N.J., Rayner, P.J. & Compston, D.A. Identification of A2B5-positive putative oligodendrocyte progenitor cells and A2B5-positive astrocytes in adult human white matter. *Neuroscience* 89, 1-4 (1999).
6. Patrikios, P. *et al.* Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain* 129, 3165-72 (2006).
7. Sim, F.J. *et al.* CD140a identifies a population of highly myelinogenic, migration-competent and efficiently engrafting human oligodendrocyte progenitor cells. *Nat Biotechnol* 29, 934-41 (2011).
8. Windrem, M.S. *et al.* Fetal and adult human oligodendrocyte progenitor cell isolates myelinate the congenitally dysmyelinated brain. *Nat Med* 10, 93-7 (2004).
9. Nunes, M.C. *et al.* Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain. *Nat Med* 9, 439-47 (2003).
10. Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-72 (2007).
11. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-76 (2006).
12. Avilion, A.A. *et al.* Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 17, 126-40 (2003).
13. Ellis, P. *et al.* SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Dev Neurosci* 26, 148-65 (2004).
14. Papanayotou, C. *et al.* A mechanism regulating the onset of Sox2 expression in the embryonic neural plate. *PLoS Biol* 6, e2 (2008).
15. Brazel, C.Y. *et al.* Sox2 expression defines a heterogeneous population of neurosphere-forming cells in the adult murine brain. *Aging Cell* 4, 197-207 (2005).
16. Komitova, M. & Eriksson, P.S. Sox-2 is expressed by neural progenitors and astroglia in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 369, 24-7 (2004).
17. Peltier, J., Conway, A., Keung, A.J. & Schaffer, D.V. Akt increases sox2 expression in adult hippocampal neural progenitor cells, but increased sox2 does not promote proliferation. *Stem Cells Dev* 20, 1153-61 (2011).
18. Suh, H. *et al.* In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 1, 515-28 (2007).
19. Wang, S. *et al.* Prospective identification, isolation, and profiling of a telomerase-expressing subpopulation of human neural stem cells, using sox2 enhancer-directed fluorescence-activated cell sorting. *J Neurosci* 30, 14635-48 (2010).
20. Baer, K., Eriksson, P.S., Faull, R.L., Rees, M.I. & Curtis, M.A. Sox-2 is expressed by glial and progenitor cells and Pax-6 is expressed by neuroblasts in the human subventricular zone. *Exp Neurol* 204, 828-31 (2007).

21. Knoth, R. *et al.* Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PLoS One* 5, e8809 (2010).
22. Ayuso-Sacido, A., Roy, N.S., Schwartz, T.H., Greenfield, J.P. & Boockvar, J.A. Long-term expansion of adult human brain subventricular zone precursors. *Neurosurgery* 62, 223-9; discussion 229-31 (2008).
23. Roy, N.S. *et al.* In vitro neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. *Nat Med* 6, 271-7 (2000).
24. Johansson, C.B. *et al.* Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96, 25-34 (1999).
25. Kukekov, V.G., Laywell, E.D., Thomas, L.B. & Steindler, D.A. A nestin-negative precursor cell from the adult mouse brain gives rise to neurons and glia. *Glia* 21, 399-407 (1997).
26. Chen, K., Hughes, S.M. & Connor, B. Neural progenitor cells derived from the adult rat subventricular zone: characterization and transplantation. *Cell Transplant* 16, 799-810 (2007).
27. Maric, D., Maric, I. & Barker, J.L. Buoyant density gradient fractionation and flow cytometric analysis of embryonic rat cortical neurons and progenitor cells. *Methods* 16, 247-59 (1998).
28. Palmer, T.D., Markakis, E.A., Willhoite, A.R., Safar, F. & Gage, F.H. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci* 19, 8487-97 (1999).
29. Ferri, A.L. *et al.* Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development* 131, 3805-19 (2004).
30. Mothe, A.J., Zahir, T., Santaguida, C., Cook, D. & Tator, C.H. Neural stem/progenitor cells from the adult human spinal cord are multipotent and self-renewing and differentiate after transplantation. *PLoS One* 6, e27079 (2011).
31. Corti, S. *et al.* Direct reprogramming of human astrocytes into neural stem cells and neurons. *Exp Cell Res* 318, 1528-41 (2012).
32. Avellana-Adalid, V., Nait-Oumesmar, B., Lachapelle, F. & Baron-Van Evercooren, A. Expansion of rat oligodendrocyte progenitors into proliferative "oligospheres" that retain differentiation potential. *J Neurosci Res* 45, 558-70 (1996).
33. Chen, Y. *et al.* Isolation and culture of rat and mouse oligodendrocyte precursor cells. *Nat Protoc* 2, 1044-51 (2007).
34. Engelen, E. *et al.* Sox2 cooperates with Chd7 to regulate genes that are mutated in human syndromes. *Nat Genet* 43, 607-11 (2011).
35. Sharov, A.A. *et al.* Identification of Pou5f1, Sox2, and Nanog downstream target genes with statistical confidence by applying a novel algorithm to time course microarray and genome-wide chromatin immunoprecipitation data. *BMC Genomics* 9, 269 (2008).
36. Wang, Z. *et al.* Notch signaling pathway regulates proliferation and differentiation of immortalized Muller cells under hypoxic conditions in vitro. *Neuroscience* 214, 171-80 (2012).
37. Neves, J., Parada, C., Chamizo, M. & Giraldez, F. Jagged 1 regulates the restriction of Sox2 expression in the developing chicken inner ear: a mechanism for sensory organ specification. *Development* 138, 735-44 (2011).
38. Orlova, K.A. *et al.* Early progenitor cell marker expression distinguishes type II from type I focal cortical dysplasias. *J Neuropathol Exp Neurol* 69, 850-63 (2010).
39. Phi, J.H. *et al.* Sox2 expression in brain tumors: a reflection of the neuroglial differentiation pathway. *Am J Surg Pathol* 32, 103-12 (2008).
40. Bani-Yaghoub, M. *et al.* Role of Sox2 in the development of the mouse neocortex. *Dev Biol* 295, 52-66 (2006).

41. Kappadakunnel, M. *et al.* Stem cell associated gene expression in glioblastoma multiforme: relationship to survival and the subventricular zone. *J Neurooncol* 96, 359-67 (2010).
42. Lindberg, N., Kastemar, M., Olofsson, T., Smits, A. & Uhrbom, L. Oligodendrocyte progenitor cells can act as cell of origin for experimental glioma. *Oncogene* 28, 2266-75 (2009).
43. Ogden, A.T. *et al.* Identification of A2B5+CD133- tumor-initiating cells in adult human gliomas. *Neurosurgery* 62, 505-14; discussion 514-5 (2008).
44. Sugiarto, S. *et al.* Asymmetry-defective oligodendrocyte progenitors are glioma precursors. *Cancer Cell* 20, 328-40 (2011).
45. Alonso, M.M. *et al.* Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas. *PLoS One* 6, e26740 (2011).
46. Annovazzi, L., Mellai, M., Caldera, V., Valente, G. & Schiffer, D. SOX2 expression and amplification in gliomas and glioma cell lines. *Cancer Genomics Proteomics* 8, 139-47 (2011).
47. Gangemi, R.M. *et al.* SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem Cells* 27, 40-8 (2009).

Neural Stem Cells from Mammalian Brain: Isolation Protocols and Maintenance Conditions

Jorge Oliver-De la Cruz and Angel Ayuso-Sacido
*Regenerative Medicine Program, Centro de Investigación Príncipe Felipe,
 REIG and Ciberneted
 Spain*

1. Introduction

Traditionally, the adult brain has been considered a quiescent organ, lacking the production of new cells, or more exactly, new mature and functional neurons. This dogma has been widely refused in the last decades with the discovery of proliferative cells with stem cell properties in the adult brain.

First evidences come from the demonstration of neurogenesis in non-mammal vertebrates such as birds or lizards (as reviewed in Garcia-Verdugo et al., 2002). Neurogenesis was also confirmed to occur in adult mammals, like mice and rats, and, finally, in primates and humans (for a complete revision see Gil-Perotín et al., 2009). Though the process of neurogenesis in the adult is primarily confined to the subventricular zone (SVZ) and the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus, glial progenitors exist in other brain regions. These widespread glial progenitors remain quiescent and do not generate mature glial cells, but, in certain situations such as traumatic injury, they may act as true stem cells (Belachew et al., 2003; Rivers et al., 2008).

The terminology of stem cell, progenitor cell and precursor cell has been adapted from others tissues. Basically, a *bona fide* neural stem cell (NSC) must meet all these three features: capacity of self-renewal, capacity to differentiate into the three neural lineages (neuron, astrocyte and oligodendrocyte) and, finally, the ability to regenerate neural tissue. When cells show a limited self-renewal and are already committed toward a specific fate, they are classified as progenitor cells, while the term “precursor” represents intermediate stages.

Neural stem/progenitor cells (NSPc) primary cultures provide the best *in vitro* model to study proliferation and differentiation signaling pathways, a difficult issue to address *in vivo*. Additionally, these cells might be used in future replacement cell therapies, thus motivating the development of protocols aimed to isolate and expand these cells *in vitro*. These protocols display significant variations among them, and the introduction of new technologies has increased drastically their number. The differences in the protocols have rendered different results in terms of stem cell subpopulations, differentiation potential and the amount of cells. The last is especially relevant in the case of human samples because of their low availability.

Therefore, the aim of this chapter is to recapitulate some of these technical differences that could induce variances in the final results. We have analyzed the main isolation protocols from the two canonical neurogenic zones in the adult (subventricular zone and hippocampus), described for both animal models (mouse and rat) and human.

2. Neural stem/progenitor cell isolation

The NSPc isolation procedures follow common steps including tissue dissection, digestion and cell enrichment. However, comparing the different protocols found in the bibliography, it is notable the presence of significant differences between them even when they are consecutive works from the same group. The introduction of new technologies has also increased drastically the number and variety of protocols. Additionally, some tissues like normal human brain are particularly difficult to manage due to their low availability, which requires improvements in the protocol to include modifications that increase the rate of isolated cells. Interestingly, the diversity of isolation procedures results in the obtaining of different stem/progenitor cell subpopulations with distinct differentiation potential, and might be also responsible for the, sometimes contradictory, results observed in the literature.

Although the development of standard protocols would be the best option to assure that results can be easily compared, in the practice, this is almost impossible. Different groups have generated independently alternative procedures for the isolation, dissociation and enrichment of NSPc. Furthermore, the animal model, the specific location of the brain sample, or even the characteristics of the experiment have requirements that would make unmanageable the use of universal procedures. Usually, the same group employs very similar strategies to isolate cells from different samples, independently of their developmental stage or animal/human origin. Nevertheless, it will be interesting to establish flexible guidelines to indicate what can be modified from the standard procedures and how to do so.

The basic scheme followed by NSPc isolation protocols is reflected in figure 1, and we will discuss the specific methodology associated with every step in the following headings

2.1 Tissue dissection methods

The origin of the tissue influences the type of isolated cells as well as their proliferation and differentiation capacity. A number of profound differences have been reported between brain samples from different species (mouse, rat or human) or from different stages of development within a given specie (Gritti et al., 2009; Svendsen et al., 1997). However, the accurate dissection of specific regions of the brain has become more relevant as the knowledge on the NSPc biology and location increases. In fact, regardless of the animal model, one of the main factors that might determine the final results is the specific location of the brain tissue from where NSPc are isolated.

Different regions of the brain have been used as a primary source of NSPc and, consequently, discrepancies in the isolated cells have been reported. In this sense, analyzing the distinct approaches for the tissue dissection might be useful to contextualize such a controversy.

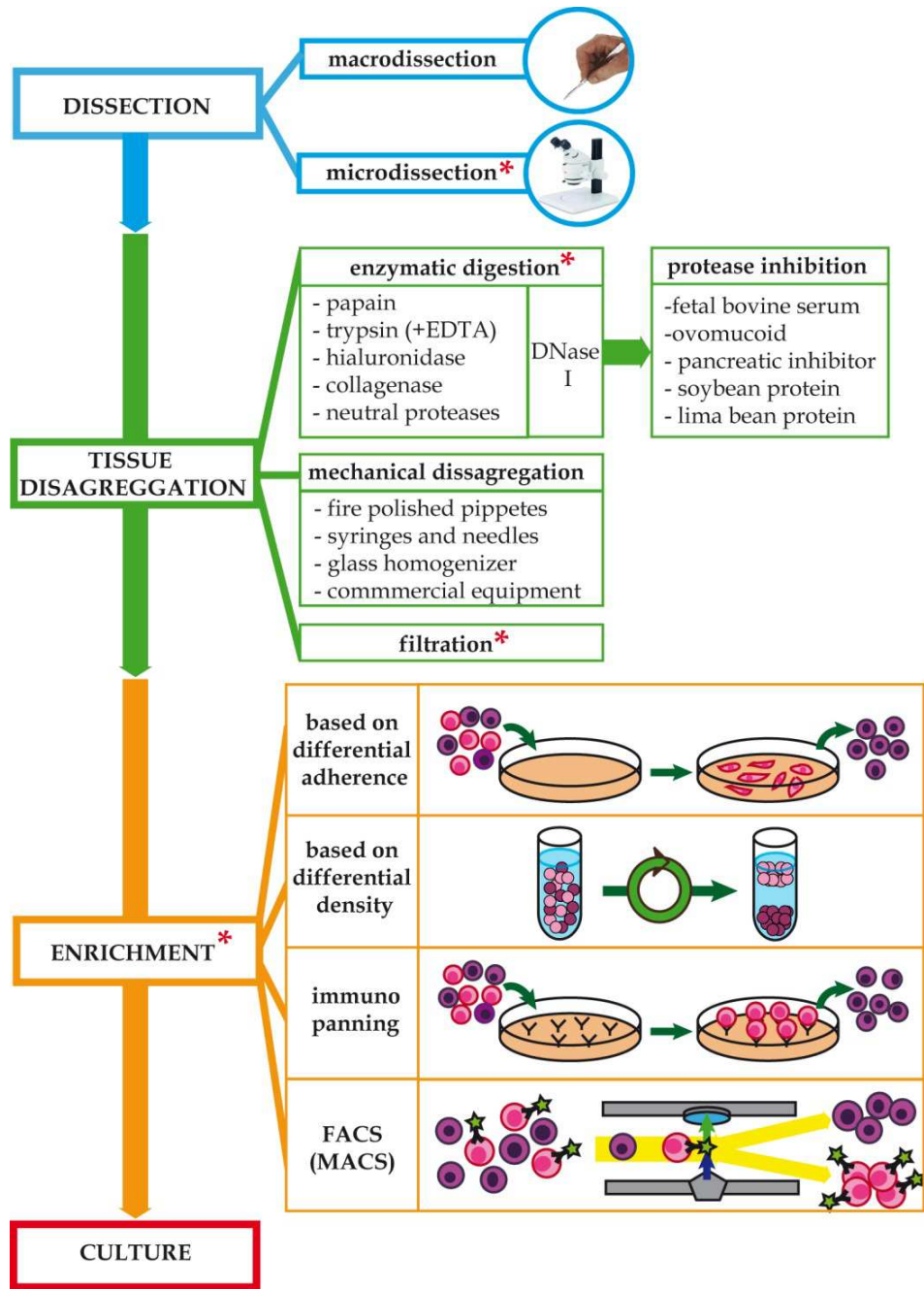


Fig. 1. Diagram depicting the main steps of standard neural stem/progenitor cell isolation protocol. Headings marked with an asterisk are not always included.

We might consider three different levels of dissection according to the amount and location of tissue, ranging from large unselected brain tissue to microdissection. In a first level, a number of works start from whole brain (e.g. Von Visger et al., 1994) or large areas that include heterogeneous regions (e.g. whole human temporal lobe, Kirschenbaum et al., 1994). In these cases, the results can be highly variable, because of the different types of progenitors coming from distinct locations and giving rise to an artefactual impression of cell heterogeneity. An intermediate step of complexity is found in those works that use tissue from specific areas, but without the exclusion of contiguous tissues, i.e. macrodissection. In this regard, some authors reported the presence of multipotent stem cells from different regions of the adult parenchyma that differ from canonical neurogenic zones (SVZ and SGZ), e.g. from striatum (Reynolds & Weiss, 1992). However, these cells might arise from the cross-contamination of adjacent neurogenic regions (Lois & Alvarez-Buylla, 1993). Likewise, as will be discussed later, the existence of real neural stem cells in adult dentate gyrus of hippocampus has become a controversial subject. Some authors claim that there are true stem cells from this zone. However, others state that these isolated cells should be considered progenitors because of their low proliferation *in vitro* and their doubtful multipotentiality. The main argument of these authors is the lack of fine dissection, and the inclusion of neural stem cells from other adjacent tissues, like SVZ. Therefore, considering the current knowledge on NPSc niches location, an exhaustive microdissection is essential to take out the region of interest in a reliable way before starting the isolation procedures. Then, it is highly recommendable the use of thin slices of tissue for the accurate microdissection of different compartments under a dissecting microscope (e.g. Seaberg & van der Kooy, 2002).

Tissue dissection is particularly challenging in the case of human surgical samples, where orientation and anatomical organization is usually altered after surgery, making difficult the recognition of particular zones and, consequently, a good dissection. Alternatively, some authors have demonstrated the isolation of viable cells from postmortem tissue, especially in the case of human samples (e.g. Schwartz et al., 2001). While these procedures might be the only way to access some type of tissues, there might be some logistical inconveniences, the main one being that collection of tissue and cell isolation protocols need to be performed within few hours, because the number of NSPc decreases with time (Leonard et al., 2009; Xu et al., 2003), especially when samples are exposed to environmental temperature instead of 4°C (Laywell et al., 1999).

2.2 Tissue digestion methods

2.2.1 Enzymatic dissociation

NSPc are surrounded by a highly structured extracellular matrix mainly composed by lecticans, hyaluronic acid, tenascin-C and tenascin-R (Rutka et al., 1988). These molecules interact among them and with membrane molecules on cell surfaces, and can regulate part of their behavior.

Therefore, one of the most successful strategies for removing NSPc from the rest of the tissue implies the use of proteases to degrade this matrix.

The first step, to prepare the tissue for enzymatic digestion, involves the mincing into small pieces (less than 1 mm³) in order to provide more degradable surface for the action of

proteases. In this sense, the use of two different enzymes stands over the rest in the literature: trypsin (examples of its applications in different samples and developmental stages can be read at Kirschenbaum et al., 1994; Kukekov et al., 1997; Reynolds et al., 1992; Reynolds&Weiss, 1992; Svendsen et al., 1998) and papain (Babu et al., 2007; Roy et al., 2000a; Wang et al., 2000; Windrem et al., 2004). Trypsin is the most employed one, and is often combined with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), a Ca^{2+} chelating agent that weakens intercellular unions. Regarding the concentration and the incubation time, it is not always possible to compare between different protocols as the enzyme units are not always specified and the incubation time ranges from 10 to 90 minutes. Additionally, other enzymes can be found in the bibliography such as hyaluronidase (e.g. Gritti et al., 1995; Weiss et al., 1996), collagenase (e.g. Uchida et al., 2000), and neutral protease (dispase) (e.g. Babu et al., 2007), alone or in combination with others.

Generally, the use of proteases is linked to the utilization of Desoxyribonuclease I (DNase I), usually from bovine origin, in order to eliminate the DNA mucus originated by cell lysis, which could hinder cell survival and further experiments.

In any case, the employment of enzyme specific buffers (with adjusted pH and containing activators) is necessary to allow the action of these enzymes. In some cases, antibiotic/antimitotic is added to the digestion solution to prevent contamination. At this stage, some authors also include kynurenic acid in order to reduce glutamate excitotoxicity through NMDA receptor channels (e.g. Reynolds&Weiss, 1992). Afterward, the use of protease inhibitors is necessary to stop enzymatic reaction. Papain is usually neutralized with fetal bovine serum, whereas in the case of trypsin, the most employed method includes ovomucoid, although there are commercially available soy, lima bean, and basic pancreatic protein-based inhibitors.

The criterion for the choice of one or another enzyme is not clear, and frequently it has more to do with the previous experience and skills of the group. Nevertheless, as a general rule, embryo and early fetal samples require less amount of enzyme due to its laxity. For this reason, some protocols reduce protease concentrations and/or exposure time (e.g. Svendsen et al., 1998) or even recommend the use of mechanical disaggregation techniques alone (e.g. Ciccolini&Svendsen, 1998; Reynolds&Weiss, 1996).

The enzymatic digestion is a critical step because it affects directly to the NSPc survival rate. In this sense, some studies have been done to compare cell survival after dissociation with different protease. Maric et al., 1998, used murine embryonic tissue to evaluate the efficacy of papain, trypsin, and collagenase treatment, or mechanical disaggregation alone. The results indicate that papain dissociation is optimal, achieving the maximum reproducible cell recovery and viability. On the contrary, trypsin, collagenase, and mechanical dissociations resulted on suboptimal and highly variable yields. Another study, carried out by Panchision et al., 2007 also compared the results obtained for mouse embryonic stem cell isolation when using papain, Tryple™ (a commercial analog of trypsin), or collagenase/neutral protease commercial cocktails (Accutase™ and Liberase-1™). Data also confirmed that mechanic dissociation induced more variability, cell death and more number of aggregates. However, Tryple™ and papain produced more quantity of DNA mucus (but not an increased cell death) and a lower adherence to culture plate after planting. They conclude that the best results were obtained with papain, independently of the exposure time to the enzyme.

Moreover, this work also revealed another important factor to take into account when optimizing protease dissociation: cell surface markers can be altered by these enzymes, inducing false negatives when immunocytochemistry or Fluorescent Activated cell sorting is performed just after isolation. Table 1 includes a list of sensitive markers described in this paper and similar reports. In addition, another work detected that trypsin cleavage can lead to an increased positivity of some tumor -related surface markers, depending on the state of glycosylation (Corver et al., 1995).

	enzyme -sensitive	very weakly enzyme -sensitive
Trypsin	hCD133, CD31, O4, CD81, c14, Ca125, BMA180	A2B5, CD15
Papain	PSA-NCAM, CD24, BMP IA, BMP IB	CD15, O4, CD81
Liberase-1™	BMP IA, BMP IB	
Accutase™	none of the studied	
Tryple™	none of the studied	

Table 1. List of enzyme – sensitive markers that are reported in Corver et al., 1995; Panchision et al., 2007; and commercial report by Reiß et al (Miltenyi). CD133 has been reported to be sensitive to trypsin treatment in human cells, but not in rodent cells.

2.2.2 Mechanical disaggregation

Usually, the enzymatic digestion is not enough to remove the NSPc from the remaining tissue. After or during enzymatic digestion, the tissue must be triturated to break up the digested pieces into a single cell suspension. It is a dramatic process that ends up with an important number of dead cells. However, different strategies have been described in the literature in order to reduce, to some extent, this number. The most common method consists in passing the suspension through fire polished glass pipettes, due to their high availability and lower price (e.g. Ciccolini & Svendsen, 1998; Gage et al., 1995; Reynolds&Weiss, 1992). Moreover, they can be narrowed into different diameters, adapting their thickness to samples of different size. Many protocols include the sequential trituration through pipettes with decreasing diameters in order to disaggregate the tissue in successive steps and reduce cell death (e.g. Wang et al., 2000). Nevertheless, this system also presents some technical problems. First, cells display a relative adherence to glass and might be lost. Furthermore, as glass pipettes are usually prepared specifically for each experiment, their diameter can vary, and therefore, different cell survival rates can be obtained. The cell adherence issues might be partially resolved by coating pipettes with silicone. Alternatively, some commercially available plastic pipettes (Kukekov et al., 1997) are treated to reduce the adherence, but they cannot be fire polished.

Another strategy is based on the utilization of sterile syringes and needles (e.g. Shi et al., 1998). In this sense, a large range of needle gauges is available commercially, ensuring the reproducibility of the technique; however, their edges are too sharp and that results in an increase in cell death. Although less frequent, it is worth mentioning the use of different devices like the glass homogenizer, used for embryonic neural stem cell isolation (Carpenter

et al., 1999), and some commercial equipment that appeared in the last years, promising a higher efficiency via the automation of the isolation procedure (Reiß et al (Miltenyi)).

2.2.3 Filters utility

Some groups, after enzymatic digestion and mechanical disaggregation, include a filtering step to remove the debris from the cell suspension. This additional step might eliminate undissociated tissue pieces as well as avoid the presence of necrotic particles in the final pellet that would potentially induce cell death. However, it also reduces the final number of viable cells trapped into the filter. In any case, the use of filters usually requires a DNase I treatment, to remove the mucus that can difficult the filtering, and it is strongly recommended the dilution of cell suspension in a considerable volume of medium. Regarding the type and size of the filters, some authors describe the use of cell strainers, whereas others prefer sterile gauze (e.g. Kukekov et al., 1997). The mesh size also differs among protocols (40 µm (Wang et al., 2000), 70 µm (Rietze et al., 2001), 100 µm, etc), and should be chosen in accordance with the efficiency of preceding methodology.

2.3 Neural stem/progenitor cells enrichment procedures

The initial protocols for NSPc isolation were designed with the only purpose of isolating and culturing these cells to study their biology *in vitro*. However, as the knowledge on the biology and differentiation potential of NSPc increased, it was evident that cell cultures comprised a number of different subpopulations with different degree of stemness. Consistently with this reality, many authors have recently included separation steps into their NSPc isolation protocols. This separation is usually based on the NSPc phenotypic characteristics closely related to their stem cell features.

In this sense, the first works on NSPc isolation and culture described a selection based on their capacity to proliferate in the chosen medium and growth factors. Obviously, it was not enough to discriminate heterogeneity. Consequently, many technical approaches have been developed since then, for the enrichment of a specific subpopulation. This way, the biological significance behind the molecule chosen to enrich for a specific type of cell and the technology used for the procedure become an important step determining the differentiation potential of the final cell culture. The current techniques for the separation and enrichment of NSPc are described below.

2.3.1 Methods based on differential adherent properties of cells

One of the first methodologies for the enrichment of particular subpopulations was based on the differential attachment of cells to the culture plate due to their particular adhesion molecule patterns. By optimizing some parameters like substrates and time in culture it is possible to distinguish between different types of cells. Astroglial cells show the biggest adherence, even in untreated culture plate, whereas oligodendrocytes can be easily detached through the agitation on a rotary shaker at slow revolutions (200-300 rpm) for 12-20 h. This procedure has demonstrated to be useful, easy and affordable. As a consequence, it has been common in the purification of specific cell types like oligodendrocytes (McCarthy & de Vellis, 1980; Chen et al., 2007b).

Taking advantage of these properties, Lim&Alvarez-Buylla, 1999, reported the isolation of 4 cell fractions using serial streaming of medium or PBS over the surface of poly-D-lysine treated plates, and a final step with trypsin. The first fraction (or fraction 1), which contains the less adherent cells, was enriched in PSA-NCAM and Tuj1 (identified as migrating neuroblasts). On the contrary, cells from the most adherent fraction (fraction 4) were GFAP⁺ and show characteristics of neural stem cells (type B/C according to the model of SVZ organization (Fig.2). However, it is important to mention that this procedure does not allow the obtaining of high purity cultures.

2.3.2 Differential gradient centrifugation

Another group of technical approaches for NSPc enrichment is based on fractionating cell populations according to their buoyant density. Previously, the cells are dissolved in specific solvents that, after centrifugation, generate a density gradient. The cells distribute in this gradient and can be collected separately. The gradient might be formed by using different types of reagents, being Percoll the most widely used (e.g. Palmer et al., 1999; K. Chen et al., 2007a). It consists of colloidal silica particles coated with a layer of polyvinylpyrrolidone (PVP) that can be used to form solution densities between 1.00 and 1.20 g/ml. A combination of Percoll gradients can be generated in order to separate more subpopulations. Using a discontinuous density gradient, Maric et al., 1998 reported the isolation of 20 different bands and the delimitation of density bands can be facilitated by commercial color-coded density marker beads. While its application has become very common because of its low interaction with cells and low toxicity, it is restricted to research as it may contain variable quantities of endotoxin (PVP). Alternatively, density gradients can be also generated using sucrose solutions (Johansson et al., 1999) and Bovine Serum Albumin (Ericsson, 1977).

2.3.3 Immunopanning

Initial immunopanning applications were essentially directed to eliminate specific cell subpopulations by antibody union and complement-mediated lysis (e.g. Gard&Pfeiffer, 1993). Nevertheless, the present acceptation of the immunopanning technic comprises the purification of a cell population by exploiting their differential binding to the culture dishes previously coated with a cell-surface antibody. Cells expressing this surface antigen are retained on the dish and are thereby separated from the remaining cell population. It has been especially applied to the isolation of oligodendrocyte progenitor cells, using A2B5 or O4 (Barres et al., 1992; Wu et al., 2009; Mayer-Proschel, 2001) as molecular surface markers, but it can also be adapted to segregate immature neurons (PSA-NCAM) (Ben-Hur et al., 1998; Schmandt et al., 2005). Although the use of immunopanning has become less popular with the introduction of Fluorescence-activated cell sorting (FACS) technology, some authors had reported that immunopanning provides a higher survival (Mayer-Proschel, 2001).

2.3.4 Fluorescence activated cell sorting (FACS)

The main improvement in terms of separation and enrichment of specific NSPc comes with the introduction of the FACS technology. As a specialized form of flow cytometry, it provides a method for sorting heterogeneous cells based upon the specific union of a fluorophore-labeled antibody to a cell surface maker. In addition to antibodies, other

molecules like lectins can be used to recognize the glycosylation state of some membrane epitopes (as reviewed in Kitada et al., 2011).

The main advantage of this procedure is its high sensitivity, reaching values of purity above 95%. Moreover, the possibility of labeling cells with simultaneous antibodies allows the isolation of a particular subset of cells with a combination of membrane markers (e.g. Uchida *et al*, 2000). Moreover, the use of this technology makes possible the sorting of cells according to the expression of either cytoplasmic or nuclear markers. This advantage allowed the design of transgenic animal models that express a given fluorophore under the control of specific promoters. Additionally, the introduction of small DNA molecules can also induce the expression of a fluorescent molecule in both animal and human cells.

Alternatively, magnetic labeled antibodies might be used through a variation known as Magnetic-activated cell sorting (MACS). This technology uses a more reduced and affordable equipment, although it does not allow the labeling of more than one surface marker. Table 2 lists the stem cell markers used in the isolation of NSPc subpopulations by FACS or MACS.

NEURAL STEM CELLS	ANTIBODY	Integrin $\alpha 1\beta 5$	Yoshida et al., 2003
		CD15	Capela et al., 2002; Corti et al., 2005; Panchision et al., 2007
		CD24LOW	Murayama et al., 2002; Rietze et al., 2001
		CD133	Cortie tal., 2005; Panchision et al., 2007; Uchida et al., 2000
		CXCR4	Corti et al., 2005
		EGFR1 (EGF)	Ciccolini et al., 2005; Pastrana et al., 2009
		NOTCH1	Johansson et al., 1999
	LECTINS	PHA-E4	Hamanoue et al., 2008
		WGA	Hamanoue et al., 2008
	FLUOROPHORE UNDER PROMOTOR CONTROL	p/GFAP	Doetsch et al., 1999; Pastrana et al., 2009
		p/MELK	Nakano et al., 2005
		p/MSI1	Keyoung et al., 2001
		p/Nestin	Kawaguchi et al., 2001; Keyoung et al., 2001; Roy et al., 2000a, 2000b; Sawamoto et al., 2001; Yoshida et al., 2003
		p/SOX1	Barraud et al., 2005

			p/SOX2	Brazelet et al., 2005; Ellis et al., 2004; ; Keyoung et al., 2001; Suh et al., 2007; Wang et al., 2010
LINEAGE RESTRICTED PRECURSOR	glial	ANTIBODY	A2B5	Maric et al., 2003; Nunes et al., 2003; Windrem et al., 2002; Windrem et al., 2004; Wright et al., 1997
			CD44	Liu et al., 2004
			GD3	Maric et al., 2003
			NG2	Aguirre et al., 2004
			O1	Duncan et al., 1992
		FLUOROPHORE UNDER PROMOTOR CONTROL	p/CNP	Aguirre et al., 2004; Nunes et al., 2004; Roy et al., 1999; Yuan et al., 2002
	neuronal	ANTIBODY	PSA-NCAM	Panchision et al., 2007; Windrem et al., 2004
		FLUOROPHORE UNDER PROMOTOR CONTROL	P/Tα1	Piper et al., 2001; Roy et al., 2000 ^a , 2000b; Sawamoto et al., 2001; Wang et al., 2000
			P/Neurogenin2	Thompson et al., 2006
		OTHERS	Cholera toxin	Maric et al., 2003
			Tetanus toxin	Maric et al., 2003

Table 2. Main markers used for NSPc isolation by FACS or MACS.

3. Primary neural stem/progenitor cell culture

3.1 Culture conditions

3.1.1 Culture media

The culture media commonly used to grow NSPc includes two components, the basal media and supplements and the use of growth factors. The basal culture media formulation does not change significantly between different groups. It is based on the use of Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), which is composed by a defined mixture of inorganic salts, amino acids and vitamins among other nutrients. DMEM is usually combined (1:1) with Ham's F-12 (F-12), which basically increases the level of some nutrients and provides different inorganic salts. Although less frequent, other alternatives with similar characteristics have been reported as basal media, such as Neurobasal™, or Ex Vivo™ 15 (e.g. Babu et al., 2007).

The basal media is frequently supplemented with N2 or B27 supplements which contain nutrients like insulin, transferrin or putrescine, among others. These supplements cannot be

added to basal formulation until they are used because of their short life at 4°C. Although both of them might be used, even in combination, they have different properties that may influence cell culture behavior. B27 has a more complex composition than N2 supplement and only enhances cell survival during the period immediately following isolation (Svendsen et al., 1995), while N2 offers the same results, at a lower price. Babu et al. (2007) concluded that monolayer cells maintained with N2 supplement generated more neurons after differentiation, whereas B27 supplement promoted proliferation.

3.1.2 Serum and growth factors

Although basal media and supplements are quite similar in most cases, the most important issue in terms of culture media is the use of either specific growth factors or serum. The first works on NSPc isolation and maintenance described the use of serum in their culture media. However, as the knowledge on NSPc biology increased, researchers found that the use of serum, generally fetal bovine serum (FBS), had several disadvantages. As a complex solution of undefined composition that can vary drastically among batches, the use of serum does not contribute to improve our knowledge about trophic signals requirements. Additionally, it is not a physiological condition, since neural stem cells are not exposed directly to serum *in vivo*. Finally, serum includes a combination of different growth factors that are able to maintain stem cell phenotype and also induce differentiation. All these reasons made the authors substitute serum for a specific combination of purified growth factors. The utilization of two main growth factors stands out from the rest: fibroblast growth factor 2 (FGF-2, also called basic FGF or bFGF) and epidermal growth factor (EGF), alone or in combination. Moreover, FGF-2 must be used in combination with heparin, which mediates the binding of the growth factor to its receptor (Yayon et al., 1991).

Initial works (Reynolds, 1992; Reynolds & Weiss, 1992) described the isolation of an EGF-responsive neural stem cell population from striata/lateral ventricle, although some authors reported that similar cell cultures could be also maintained with FGF (Gritti et al., 1995; Vescovi et al., 1993). Similarly, some works also found a synergic effect of both EGF and FGF in proliferation, but only at low cell densities (Svendsen, 1997; Tropepe, 1999). Finally, a series of studies (Martens et al., 2000; Tropepe et al., 1999; Ciccolini, 2001; Maric et al., 2003) demonstrated that FGF- responsive cells arise earlier at development, and then give rise to both EGF/FGF- responsive cells. Moreover, it was revealed that the acquisition of EGF responsiveness is promoted by FGF *in vitro* (Ciccolini & Svendsen, 1998). First isolations could be explained with the discovery of a small autocrine/paracrine FGF production by neural stem cells, allowing the survival of FGF-2 dependent cells without FGF until the acquisition of EGF responsiveness (Maric et al., 2003).

Other growth factors that have been reported to support cell culture are Transforming growth factor alpha (TGF- α) (Reynolds et al., 1992), Leukemia inhibitory factor (LIF) and its equivalent Ciliary neurotrophic factor (CNTF) (Carpenter et al., 1999), or Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), although its capacity to enhance later neuronal production and survival has been questioned (Kirschenbaum & Goldman, 1995; Ahmed et al., 1995; Reynolds & Weiss, 1996).

Platelet-derived growth factor alpha (PDGF α) is frequently used in the maintenance media for oligodendrocyte progenitor cells. The signaling pathway through the PDGF α /PDGFR α

has different effects depending on the stage of differentiation of these progenitors: it provides signals favoring proliferation and migration in murine and human oligodendrocyte progenitors (Wilson et al., 2003; Calver et al., 1998), whereas later in development is related with cell survival (Gogate et al., 1994). Similarly, FGF promotes proliferation and blocks differentiation of oligodendrocyte progenitors, in part through the modulation of PDGFR α receptors expression (McKinnon et al., 1990).

Finally, some works have attempted to co-culture NSPc in the presence of other supportive cells like astrocytes (Richards et al., 1992; Lim et al., 1999), that seem to favor the NSPc growth by physical contact, or endothelial cells, that also enhance cell proliferation via VEGF production (Sun et al., 2010).

3.1.3 pH and oxygen levels

The metabolic processes undergone by the cells in culture give rise to acidic components that eventually are released to the media, thus decreasing the pH. This alteration, easily followed by the inclusion of a pH indicator like phenol red, has a direct influence in the behavior of the cells. Therefore, buffering agents are commonly added to medium formulation in order to control variations in the pH. In this sense, two main systems are routinely used in the elaboration of the media: sodium bicarbonate buffer, which is dependent on the CO₂ concentration present in the incubator, and HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), independent of atmospheric CO₂. Although HEPES is better at maintaining physiological pH controls, the exposure of HEPES-containing media to light must be reduced as HEPES-containing media generates hydrogen peroxide when exposed to ambient light (Zigler et al., 1985).

In contrast, the level of O₂ tension remains to be optimized for NSPc cultures. The standard conditions to culture NSPc had included atmospheric levels of O₂ (21%), although physiological levels are much lower (around 3%). Several studies have confirmed that NSPc expansion under low level of O₂ correlates with the expression of stemness markers and higher survival rate both *in vitro* and *in vivo* after engraftment (reviewed in De Filippis & Delia, 2011).

3.2 Monolayer versus neurosphere cultures

To maintain and propagate stem cell cultures different authors have published two alternative methods of NSPc culture and expansion: as free-floating cell clusters (neurospheres) or as adherent cultures forming a monolayer on the plate surface.

The neurosphere assay has been the most extended method to demonstrate the presence of NSPc in culture (Reynolds et al., 1992) and it is still used with different modifications (Rietze & Reynolds, 2006). Some authors claim that each neurosphere represents a microenvironment that recapitulates neurogenic niche and allows survival of stem cells *in vitro* (Bez et al., 2003) through direct cell-to-cell interaction. Nevertheless, a single neurosphere contains only a small percentage of true stem cells, whereas the remaining cells are in different stages of differentiation. Necrotic and apoptotic cells are also present (Lobo et al., 2003). Interestingly, it has been reported that committed progenitors, like oligodendrocyte precursors, can generate cell clusters similar to neurospheres (Chen Y. et al., 2007).

This culture method has also several technical disadvantages. First, when neurospheres become larger, the diffusion of nutrients and growth factors through the neurosphere is compromised (Svendsen et al., 1997b), which makes difficult the interpretation of some experimental results. Second, packed neurospheres do not allow the tracking of individual cells, which also hinders studies relating to differentiation processes. Finally, recent publications demonstrate that neurospheres are not static particles originated from a single cell and isolated from the rest of the neurospheres and cells (Rietze, 2006). On the contrary, they are dynamic structures within the culture, where cells are exchangeable from one to another sphere. This effect, may be circumvented by either using a limiting dilution analysis to obtain a single cell in each well or using semisolid cultures by adding methylcellulose (Gritti et al., 1999; Kukekov et al., 1997) or collagen (Neural Colony-Forming Cell Assay (Louis et al., 2008)).

By contrast, monolayer cultures obviate some of these restrictions. They can be used to study the properties of stem cells at individual cell level, although it does not allow cell interaction during differentiation. Moreover, cells are exposed homogeneously to growth factors and serum, with the consequent reduction in cell heterogeneity.

In all, there is not a prevalent method over the other. It has not been demonstrated a total equivalence between both type of cultures and the two methods have advantages and limitations that researchers should take into consideration in the experimental design. The formation of neurospheres may be promoted by following several strategies, being the most common one the use of nonadherent surfaces like poly-2-hydroxyethyl methacrylate (Kukekov et al., 1999). Furthermore, it has been also reported the addition of mercaptoethanol to avoid cell attachment (Kukekov et al., 1997). However, not all attempts to transform an adherent culture into neurospheres have been successful (Walton et al., 2006). Alternatively, cell attachment may be induced by coating the plate surface with charged molecules such as poly-l-ornithine, poly-d-lysine or laminin.

3.3 Cell passaging

Before cells become totally confluent, it is necessary to subculture them after disaggregation of cell clusters into single cell suspensions. Regardless of the type of culture, monolayer or suspension, passaging should be performed before cells achieve their maximum confluence (monolayer) or cell cluster become necrotic (neurospheres) in order to avoid senescence associated with prolonged high cell density. The methodology employed for the disaggregation step depends on the cell type.

Adherent cells are usually detached from the surface of the culture vessel by enzymatic means. Trypsin, alone or in combination with EDTA, has been the most used protease (e.g. Palmer et al., 1997); but in the last years it has been substituted in current protocols by Tryple™, since this commercial product is free of animal- and human- derived components, less damaging to cells, and does not require the use of inhibitors.

In the case of neurospheres, cell disaggregation is performed by using mechanical procedures which involve triturating spheres with fire polished pipettes. However, this is an aggressive method that renders high levels of cell death. Enzymatic digestion can be also

used before triturating, however, this may alter the experimental results if FACS assays are conducted right after disaggregation.

An alternative method was reported by Svendsen & ter Borg, 1998 for passaging neurospheres isolated from human fetal tissue. Briefly, neurospheres were cut into 4 pieces instead of standard trituration into single cell suspension. According to their data, this sectioning method reduces cellular trauma and preserves cell interaction, allowing NSPc to proliferate more replication rounds *in vitro*.

3.4 Cryopreservation

Cryopreservation allows the maintenance of NSPc in a suspension mode awaiting for future experiments and saving expensive culture reagents. Considering the low number of cells obtained from each sample, especially in human tissue, increasing the survival ratio after long-term preservation of NSPc becomes a major concern. The main cryopreservation protocols employ dimethylsulfoxide (DMSO) diluted at 10-20% in culture media to avoid ice crystallization, accompanied by a slow cooling step in isopropanol recipients. Although less popular, glycerol can be used instead of DMSO. Cellular viability can be improved adding animal serum to freezing medium, but it can potentially introduce contaminants, and induce differentiation. In any case, cryopreservation must follow some general rules to ensure the successful preservation of cells. It must be performed during the logarithmic growth phase and high cell density in each ampoule seems to facilitate cell recuperation. Smaller neurospheres survive better than larger, so triturating cells until getting a suspension of small neurospheres improves cell survival.

Recently, a new alternative preservation method, named vitrification, has been adapted for NSPc (Tan et al., 2007). In brief, cells are sequentially submerged in a series of freezing solutions with increasing concentrations of cryoprotectant (ethylene glycol and sucrose), and finally transferred into borosilicate glass capillaries, snap-frozen and stored in liquid nitrogen. The results showed that vitrification offered the best combination of cell viability, multipotency, and preservation of structural integrity of neurospheres.

3.5 Differentiation

After isolation of proliferating cells, it is necessary to confirm the stemness characteristics of the cells, that is, the multipotent and self-renewal capacities. In this sense, cells with lower self-renewal or with potential to generate just one type of cell should be considered as progenitor cells. To evaluate the differentiation capacity, cells are exposed to differentiation signals coming from animal serum or chemically defined compounds.

The use of serum has the same problems highlighted above. Nevertheless, this is still the standard methodology, because the specific signals inducing NSPc differentiation into a specific lineage remains largely unknown. Cells maintained in defined medium tend to differentiate when exposed to serum in a variable concentration (from 1% up to 10%) (e.g. Ciccolini & Svendsen, 1998; Palmer et al., 1999; Roy et al., 2000; Wanget al., 2000), although a preference towards astroglial differentiation has been reported (Palmer et al., 1995). The use

of serum is usually accompanied by the addition of molecules such as Poly-L-ornithine, laminin or matrigel to promote adhesion to substrate, which seem to enhance differentiation of neurospheres cultures (Ciccolini & Svendsen, 1998; Reynolds & Weiss, 1996; Tropepe et al., 1999). In some cases, the removal of growth factors in conjunction with an adherent substrate has been also used to differentiate NSPc (Gritti et al., 1996).

Alternatively, media previously exposed to other cell cultures (conditioned medium) may be used to induce differentiation. Probably the most employed one is B104 conditioned medium, which is exposed to a neuroblastoma cell line and induces oligodendroglial differentiation (Young & Levinson, 1997).

Few authors have conducted NSPc differentiation assays by using growth factor cocktails in the absence of serum. Uchida et al., 2000 reported that a combination of BDNF and glial-derived growth factor (GDNF) was enough to differentiate CD133+ cells from human fetal tissue. Ling et al., 1998 reported a more specific differentiation protocol, proving that the combination of Interleukine-1b, Intelkeulin-11 and GDNF promoted the appearance of dopaminergic neurons (tyrosine hydroxylase -positive cells).

Furthermore, a number of chemical signals have been also reported to stimulate the differentiation toward a particular neural lineage.

In the case of neuronal maturation, BDNF, retinoic acid, Neurotrophin (NT3), and Sonic Hedgehog (SHH) have been associated to an enhanced neural obtaining (Babu et al., 2007; Bull & Bartlett, 2005; Dutton et al., 1999; Roy et al., 2000a, 2000b).

Oligodendroglial differentiation can be also enhanced using PDGFa, which promotes their survival (Gogate et al., 1994) in collaboration with NT3 and Triiodothyronine (T3), factors necessary for the correct development of oligodendrocytes and the expression of myelin proteins (Billon et al., 2002; Park et al., 2001).

4. Isolation from neurogenic zones

Neural stem cells seem to reside within specific niches of the adult brain. These regions are located in the subventricular zone of the lateral ventricles and the subgranular zone in the hippocampus. The origin of NSPc in these two areas has been the focus of intense debates in the literature and the isolation procedures of such cells from these specific locations need special attention.

Since the discovery of adult neural stem cells, the isolation procedures have been modified along with the increased knowledge of NSPc biology. Initially, these cells were supposed to be scattered within the brain parenchyma. However, soon after it was restricted to the SVZ, although the individual cell identity is still a source of division among researchers due to the lack of a specific marker to label neural stem cells. The nature and origin of the neural stem cell in the SGZ of the hippocampus has been also a subject of an intense debate, questioning whether they could be considered true neural stem cells or committed progenitors. Additionally, other types of neural progenitors like oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) seem to be dispersed through the white matter, and their isolation procedures and characterization have become recently relevant in the context of demyelinating diseases.

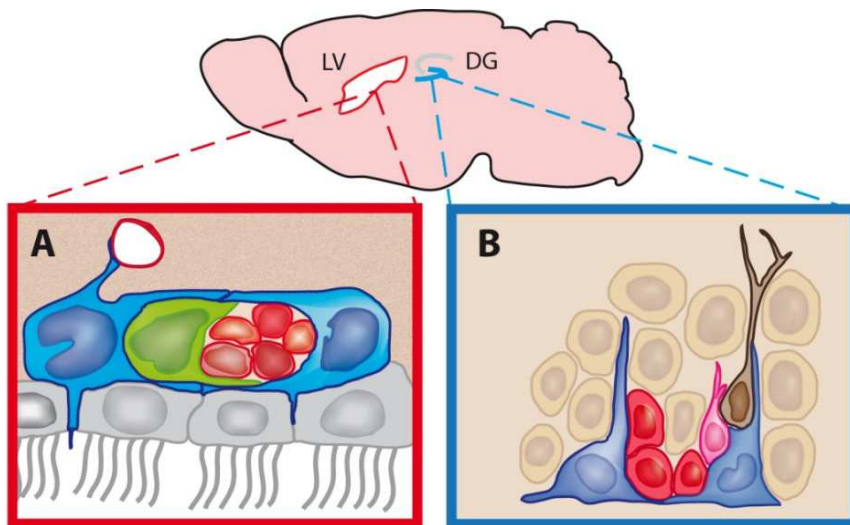


Fig. 2. Schematic representation of both adult neurogenic niches and their location in a sagittal section of rodent brain. A) The subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricles (LV) contains an astrocyte-like stem cell population termed as type B1 cells (blue) that, unlike ependymal cells (grey), contact with lumen occasionally, showing a single cilium. Through asymmetrical divisions, Type B1 cells generate rapidly dividing, transit-amplifying cells, termed as Type C (green) which, in turn, give rise to immature neuroblasts or Type A cells (red). Those neuroblasts migrate through an astroglial scaffold toward the olfactory bulb, where they fully differentiate into granular neurons. B) The subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus of hippocampus also harbors an astroglial stem cell subpopulation (green). These cells generate directly immature neuroblasts, which can divide once (Type D1, red), migrate while undergoing differentiation (Type D2, type D3, pink) and integrate as granular neurons (brown).

4.1 Subventricular zone

The first population of adult neural stem cells in mammals is located in a specific niche along the SVZ of the lateral ventricles. Several types of cells can be distinguished within these niches including type B cells (slowly dividing astroglial cells and the *bona fide* adult neural stem cells), type C cells (transit-amplifying cells derived from asymmetric division of Type B cells), type A cells (immature neuroblasts derived from Type C cells) and ependymal cells lining the lumen of the ventricle. Although this is a general model found in rodents, some differences have been described in primates and humans (for a complete revision see Quiñones-Hinojosa et al., 2006). However, the accumulating knowledge on the neural stem cells biology, and their interaction with other elements of the niches, has transformed the description of the neurogenic regions into a dynamic process where the acquisition of new findings changes the model over the time. The evolution of this model has also derived in the inclusion of changes in the NSC isolation and maintenance protocols.

Once the presence of neural stem cells was demonstrated within the adult brain of mammals, the first question to address was the location of such cells and the neurogenic

region. Early studies reported the isolation of NSC from the striatal tissue of both rat (Gritti et al., 1995; Reynolds & Weiss, 1992;) and mouse (Richards et al., 1992). Nevertheless, the striatum is a relatively large region that is not consistent with data about NSC biology. Afterwards the investigations in this field confirmed that only SVZ tissue was able to generate cell cultures with stem cell properties, whether via explants (Kirschenbaum et al., 1994; Kirschenbaum & Goldman, 1995; Lois & Alvarez-Buylla, 1993) or neurospheres cultures (Morshead et al., 1994) were used. Subsequent articles which described the isolation of neural stem cells from striatum specified the inclusion of the SVZ region within the dissected tissue (Weiss et al., 1996) and confirmed that the results of neural stem cell isolation exclusively from SVZ were identical to those obtained from extensive anatomical regions containing the SVZ (Kukekov et al., 1997). These initial works emphasized the relevance of a fine orientated dissection for a successful NSC isolation protocol.

Nonetheless, the SVZ comprises a heterogeneous population, and those early reports did not reveal the cellular identity of the NSC. Probably, the first work addressing the NSC identity *in vitro*, was performed by Johansson et al., 1999. Marking ventricular cells with DiI (a lipophilic membrane stain that diffuses laterally to stain the entire cell), they concluded that NSC were actually ciliated ependymal cells. By contrast, Doetsch et al. (1999) reported that only GFAP expressing cells (marked via adenovirus which allowed the expression of the green fluorescent protein (GFP) under the control of glial fibrillary acidic protein (GFAP) promoter) give rise to neurospheres culture. Moreover, it was previously described that those astrocyte-like cells occasionally contacted the ventricle and displayed a single cilium, suggesting that DiI isolated cultures could be originated from them instead of ependymal cells (a more complete model can be consulted at Mirzadeh et al. (2008)). Following previous findings, two new studies described that both types of cells were able to proliferate *in vitro*, but only SVZ astrocytes generated neurospheres with self-renewal and multipotential capacity (Chiasson et al., 1999; Laywell et al., 2000). These findings also marked the need for an identification and selection step in the NSC isolation protocol. With the introduction of FACS technology, two phenotypical features of NSC supported the astrocyte-like theory, the isolation of a CD15⁺ population with stem cell characteristics (Capela & Temple, 2002), a carbohydrate only expressed in astrocytes, and the identification of NSC as CD24^{low} (Rietze et al., 2001), whereas ependymal cells are CD24⁺. Using an opposite strategy to deplete adult GFAP⁺ cells, two independent studies demonstrated that the ablation of adult astrocytes resulted in the loss of multipotent neurosphere formation (Morshead et al., 2003; Imura et al., 2003). However, with the controversy surrounding the identity of NSCs, two later studies reported the isolation of CD133⁺ cells from adult brain, as previously reported by Uchida et al. (2000) for fetal tissue. Nevertheless, opposite results were obtained from each one. The first one (Corti et al., 2007) concluded that CD133 stained a small number of cells underlying the ependymal layer, and the sorting of those CD133⁺ cells leads to the isolation of a NSC population. Interestingly, Mirzadeh et al. (2008) found that 29% of the apical processes of B1 cells were positive for CD133. By contrast, Coskun et al. (2008) found that both CD133⁺ ependymal cells and NSC originate from ependymal cells. In any case, it will be necessary to find new markers in order to improve the identification and selection of either the real adult neural stem cells and the different range of progenitor cells. This will allow the study of their specific biological features and maybe modulate their behavior *in vivo*.

4.2 Subgranular zone

In the adult hippocampus, NSCs are located in the SGZ, a cellular layer found between the granule cell layer and the hilus, in the dentate gyrus. Similarly to SVZ, NSCs have been identified as astrocyte-like cells, with cell bodies located in the SGZ and vertical processes extended through the molecular layer. However, unlike what happens in the SVZ, these astrocytic cells generate an earlier immature neuroblast that divides only once and expresses neuronal markers (PSA-NCAM and doublecortin) (Type D1 cells). Those cells migrate short distances within the granule cell layer while undergoing morphological changes (type D2 and Type D3 cells) until they reach a final position and differentiate into mature granular neurons.

The first data from adult hippocampal cell cultures were published by Palmer et al., 1995. They isolated a monolayer culture from adult female rat hippocampus. These cells were capable of proliferating in serum free media supplemented with FGF. In Gage et al., 1995, they were also able to derivate a FGF-2 -dependent adherent culture that differentiates into mature neurons when engrafted into adult rat brain. Short after, *in vitro* differentiation was attempted by Palmer et al., 1997. Using several combinations of growth factors, they demonstrated the multipotency of those progenitor cells, and the enhancement of neuronal maturation when BDNF was added (similarly to NT3 and retinoic acid results), whereas serum addition promoted astroglial differentiation.

As described previously for initial reports on SVZ, those studies also isolated cells with similar features from non-neurogenic zones, including the septum of striatum. However a few years later was published the first work that isolated specific hippocampal neural stem cells from adult human samples (Kukekov et al., 1999). They observed the presence of neurospheres when cultured in non-adherent conditions by using mercaptoethanol, similarly to previous studies carried out with SVZ samples (Kukekov et al., 1997). Following the enrichment step based on the expression of GFP under the control of an specific promoter (P/T α 1:hGFP and E/nestin:EGFP), described previously to identify NSC from the SVZ, Roy et al., 2000b, isolated, for the first time, neural stem cells from human hippocampal samples. However, these results did not reproduce in mice and later works criticized the gross microdissection done in these publications. Afterwards, Seaberg & van der Kooy, 2002 tried to generate neurospheres from microdissected mouse dentate gyrus. They were unable to generate neurospheres capable of self-renewal, and multipotency was also compromised. Nevertheless, hippocampus obtained with gross dissection was able to generate neurospheres, suggesting that previous results could be explained if the dissection procedure included contaminating cells from the ventricular layer next to the hippocampus, or even white matter progenitors. They also assayed different culture conditions and dissection techniques, including dentate gyrus microdissection, and were unable to obtain proliferating neurospheres. After a number of publications showing controversial results in this regard Babu et al., 2007, using dentate gyrus microdissection from p/Nestin:EGFP transgenic mouse, were able to obtain monolayer cultures with self-renewal (up to 66 passages) and multipotency characteristics. Moreover, they observed spheres-like colonies when performing a modified neurosphere assay using semisolid medium. Additionally, after trying different media and supplements they concluded that although B27 and EGF promoted a slightly higher proliferation, N2 supplement and bFGF maintained cells differentiate better into mature neurons. Moreover, they reconfirmed that BDNF, NT3, SHH promoted neuronal differentiation, while LIF and Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) promoted glial differentiation.

More recent works found that isolated neural progenitor/stem cells display paracrine production of BMP, and the addition of noggin to culture media favors the formation of multipotential and self-renewal neurospheres (Bonaguidi et al., 2005; Bonaguidi et al., 2008).

The differences, in terms of culture media requirements, between NSC isolated from the SVZ and those from the SGZ might be due to their behavior *in vivo*. NSPc from lateral ventricle are prepared to migrate a larger distance to the olfactory lobes, while new neurons produced from dentate gyrus integrate nearby the stem cell niche and, therefore, are not prepared to maintain their stemness capacity in the absence of the niche signals.

5. Conclusions

Cell isolation and culture provides a powerful tool for the study of neural stem and progenitor cells. Although *in vitro* analysis has several limitations, and results cannot be directly extrapolated to the *in vivo* behavior of the isolated cells, it allows the analysis of their features and potential capacities in a controlled environment that can be modified and monitored more accurately.

Every step of the isolation procedure is likely to be optimized. Any protocol amendment should be tested and not considered trivial, as it can have a high impact on the cell population obtained. Consequently, isolation methods should be planned according to further experimental applications and not based on the routine practices of each research group, especially in the case of adaptation of protocols used previously for tissues collected from different species.

Moreover, it should be considered that the final purpose of most experiments is to improve our knowledge about stem cells and their clinical applications. For this reason, steps in the protocol which include reagents with undefined composition or with the possibility of introducing contaminants, such as serum, must be redesigned, because it is the only way to understand the chemical signals underlying the biological behavior of neural stem or progenitor cells.

6. Acknowledgements

We are especially grateful to Mario Soriano Navarro and Josefa Carrión Navarro for their assistance. Jorge Oliver De La Cruz is a recipient of a Predoctoral Fellowship from The FPU program (AP2008/02823), Ministerio de Educacion y Ciencia, Spain. This work was supported in part by grants from Alicia Koplowitz Foundation (JMGC, AAS, JOC) The Gent x Gent Foundation (AAS) and Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) del Instituto de Salud Carlos III (PI10/01069)(AAS).

7. References

Aguirre, A. A., Chittajallu, R., Belachew, S., et al. (2004). NG2-expressing cells in the subventricular zone are type C-like cells and contribute to interneuron generation in the postnatal hippocampus. *J Cell Biol*, Vol. 165, No. 4 (May 2004), pp. (575-589), ISSN 0021-9525

- Ahmed, S., Reynolds, B. A. & Weiss, S. (1995). BDNF enhances the differentiation but not the survival of CNS stem cell-derived neuronal precursors. *J Neurosci*, Vol. 15, No. 8 (August 1995), pp. (5765-5778), ISSN 0270-6474
- Babu, H., Cheung, G., Kettenmann, H., et al. (2007). Enriched monolayer precursor cell cultures from micro-dissected adult mouse dentate gyrus yield functional granule cell-like neurons. *PLoS One*, Vol. 2, No. 4, (2007), pp. (e388), ISSN 1932-6203
- Barres, B. A., Hart, I. K., Coles, H. S., et al. (1992). Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell*, Vol. 70, No. 1, (July 1992), pp. (31-46), ISSN 0092-8674
- Belachew, S., Chittajallu, R., Aguirre, A. A., et al. (2003). Postnatal NG2 proteoglycan-expressing progenitor cells are intrinsically multipotent and generate functional neurons. *J Cell Biol*, Vol. 161, No. 1, (April 2003), pp. (169-186), ISSN 0021-9525
- Ben-Hur, T., Rogister, B., Murray, K., et al. (1998). Growth and fate of PSA-NCAM+ precursors of the postnatal brain. *J Neurosci*, Vol. 18, No. 15 (August 1998), pp. (5777-5788), ISSN 0270-6474
- Bez, A., Corsini, E., Curti, D., et al. (2003). Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization. *Brain Res*, Vol. 993, No. 1-2, (December 2003), pp. (18-29), ISSN 0006-8993
- Billon, N., Jolicœur, C., Tokumoto, Y., et al. (2002). Normal timing of oligodendrocyte development depends on thyroid hormone receptor alpha 1 (TRalpha1). *EMBO J*, Vol. 21, No. 23, (December 2002), pp. (6452-6460), ISSN 0261-4189
- Bonaguidi, M. A., McGuire, T., Hu, M., et al. (2005). LIF and BMP signaling generate separate and discrete types of GFAP-expressing cells. *Development*, Vol. 132, No. 24, (December 2005), pp. (5503-5514), ISSN 0950-1991
- Bonaguidi, M. A., Peng, C. Y., McGuire, T., et al. (2008). Noggin expands neural stem cells in the adult hippocampus. *J Neurosci*, Vol. 28, No. 37, (September 2008), pp. (9194-9204), ISSN 1529-2401
- Brazel, C. Y., Limke, T. L., Osborne, J. K., et al. (2005). Sox2 expression defines a heterogeneous population of neurosphere-forming cells in the adult murine brain. *Aging Cell*, Vol. 4, No. 4, (August 2005), pp. (197-207), ISSN 1474-9718
- Bull, N. D. & Bartlett, P. F. (2005). The adult mouse hippocampal progenitor is neurogenic but not a stem cell. *J Neurosci*, Vol. 25, No. 47 (November 2005), pp. (10815-10821), ISSN 1529-2401
- Calver, A. R., Hall, A. C., Yu, W. P., et al. (1998). Oligodendrocyte population dynamics and the role of PDGF in vivo. *Neuron*, Vol. 20, No. 5, (May 1998), pp. (869-882), ISSN 0896-6273
- Capela, A. & Temple, S. (2002). LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron*, Vol. 35, No. 5, (August 2002), pp. (865-875), ISSN 0896-6273
- Carpenter, M. K., Cui, X., Hu, Z. Y., et al. (1999). In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells. *Exp Neurol*, Vol. 158, No. 2, (August 1999), pp. (265-278), ISSN 0014-4886
- Ciccolini, F. & Svendsen, C. N. (1998). Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) promotes acquisition of epidermal growth factor (EGF) responsiveness in mouse striatal precursor cells: identification of neural precursors responding to both EGF and FGF-2. *J Neurosci*, Vol. 18, No. 19, (October 1998), pp. (7869-7880), ISSN 0270-6474

- Ciccolini, F. (2001). Identification of two distinct types of multipotent neural precursors that appear sequentially during CNS development. *Mol Cell Neurosci*, Vol. 17, No. 5, (May 2001), pp. (895-907), ISSN 1044-7431
- Ciccolini, F., Mandl, C., Holzl-Wenig, G., et al. (2005). Prospective isolation of late development multipotent precursors whose migration is promoted by EGFR. *Dev Biol*, Vol. 284, No. 1, (August 2005), pp. (112-125), ISSN 0012-1606
- Corti, S., Locatelli, F., Papadimitriou, D., et al. (2005). Multipotentiality, homing properties, and pyramidal neurogenesis of CNS-derived LeX(ssea-1)+/CXCR4+ stem cells. *FASEB J*, Vol. 19, No. 13, (November 2005), pp. (1860-1862), ISSN 1530-6860
- Corti, S., Nizzardo, M., Nardini, M., et al. (2007). Isolation and characterization of murine neural stem/progenitor cells based on Prominin-1 expression. *Exp Neurol*, Vol. 205, No. 2, (June 2007), pp. (547-562), ISSN 0014-4886
- Corver, W. E., Cornelisse, C. J., Hermans, J., et al. (1995). Limited loss of nine tumor-associated surface antigenic determinants after tryptic cell dissociation. *Cytometry*, Vol. 19, No. 3, (March 1995), pp. (267-272), ISSN 0196-4763
- Coskun, V., Wu, H., Blanche, B., et al. (2008). CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 105, No. 3, (January 22 2008), pp. (1026-1031), ISSN 1091-6490
- Chen, K., Hughes, S. M. & Connor, B. (2007). Neural progenitor cells derived from the adult rat subventricular zone: characterization and transplantation. *Cell Transplant*, Vol. 16, No. 8, (2007), pp. (799-810), ISSN 0963-6897
- Chen, Y., Balasubramanian, V., Peng, J., et al. (2007). Isolation and culture of rat and mouse oligodendrocyte precursor cells. *Nat Protoc*, Vol. 2, No. 5 (2007), pp. (1044-1051), ISSN 1750-2799
- Chiasson, B. J., Tropepe, V., Morshead, C. M., et al. (1999). Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *J Neurosci*, Vol. 19, No. 11, (June 1999), pp. (4462-4471), ISSN 1529-2401
- De Filippis, L. & Delia, D. (2011). Hypoxia in the regulation of neural stem cells. *Cell Mol Life Sci*, Vol. 68, No. 17, (September 2011), pp. (2831-2844), ISSN 1420-9071
- Doetsch, F., Caille, L., Lim, D. A., et al. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, Vol. 97, No. 6, (June 1999), pp. (703-716), ISSN 0092-8674
- Duncan, I. D., Paino, C., Archer, D. R., et al. (1992). Functional capacities of transplanted cell-sorted adult oligodendrocytes. *Dev Neurosci*, Vol. 14, No. 2 (1992), pp. (114-122), ISSN 0378-5866
- Dutton, R., Yamada, T., Turnley, A., et al. (1999). Sonic hedgehog promotes neuronal differentiation of murine spinal cord precursors and collaborates with neurotrophin 3 to induce Islet-1. *J Neurosci*, Vol. 19, No. 7, (April 1 1999), pp. (2601-2608), ISSN 0270-6474
- Ellis, P., Fagan, B. M., Magness, S. T., et al. (2004). SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Dev Neurosci*, Vol. 26, No. 2-4, (March-August 2004), pp. (148-165), ISSN 0378-5866
- Ericsson, R. J. (1977). Isolation and storage of progressively motile human sperm. *Andrologia*, Vol. 9, No. 1, (January-March 1977), pp. (111-114), ISSN 0303-4569

- Gage, F. H., Coates, P. W., Palmer, T. D., et al. (1995). Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 92, No. 25, (December 1995), pp. (11879-11883), ISSN 0027-8424
- Garcia-Verdugo, J. M., Ferron, S., Flames, N., et al. (2002). The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain Res Bull*, Vol. 57, No. 6, (April 2002), pp. (765-775), ISSN 0361-9230
- Gard, A. L. & Pfeiffer, S. E. (1993). Glial cell mitogens bFGF and PDGF differentially regulate development of O4+GalC- oligodendrocyte progenitors. *Dev Biol*, Vol. 159, No. 2, (October 1993), pp. (618-630), ISSN 0012-1606
- Gil-Perotin, S., Alvarez-Buylla, A. & Garcia-Verdugo, J. M. (2009). *Identification and characterization of neural progenitor cells in the adult mammalian brain*. Springer, ISBN 3540887180, Berlin, Germany
- Gogate, N., Verma, L., Zhou, J. M., et al. (1994). Plasticity in the adult human oligodendrocyte lineage. *J Neurosci*, Vol. 14, No. 8, (August 1994), pp. (4571-4587), ISSN 0270-6474
- Gritti, A., Cova, L., Parati, E. A., et al. (1995). Basic fibroblast growth factor supports the proliferation of epidermal growth factor-generated neuronal precursor cells of the adult mouse CNS. *Neurosci Lett*, Vol. 185, No. 3, (February 1995), pp. (151-154), ISSN 0304-3940
- Gritti, A., Parati, E. A., Cova, L., et al. (1996). Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci*, Vol. 16, No. 3, (February 1996), pp. (1091-1100), ISSN 0270-6474
- Gritti, A., Frolichsthal-Schoeller, P., Galli, R., et al. (1999). Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. *J Neurosci*, Vol. 19, No. 9, (May 1999), pp. (3287-3297), ISSN 0270-6474
- Gritti, A., Dal Molin, M., Foroni, C., et al. (2009). Effects of developmental age, brain region, and time in culture on long-term proliferation and multipotency of neural stem cell populations. *J Comp Neurol*, Vol. 517, No. 3 (November 2009), pp. (333-349), ISSN 1096-9861
- Hamanoue, M., Sato, K. & Takamatsu, K. (2008). Lectin panning method: the prospective isolation of mouse neural progenitor cells by the attachment of cell surface N-glycans to Phaseolus vulgaris erythroagglutinating lectin-coated dishes. *Neuroscience*, Vol. 157, No. 4, (December 2008), pp. (762-771), ISSN 0306-4522
- Imura, T., Kornblum, H. I. & Sofroniew, M. V. (2003). The predominant neural stem cell isolated from postnatal and adult forebrain but not early embryonic forebrain expresses GFAP. *J Neurosci*, Vol. 23, No. 7, (April 2003), pp. (2824-2832), ISSN 1529-2401
- Johansson, C. B., Momma, S., Clarke, D. L., et al. (1999). Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*, Vol. 96, No. 1, (January 1999), pp. (25-34), ISSN 0092-8674
- Kawaguchi, A., Miyata, T., Sawamoto, K., et al. (2001). Nestin-EGFP transgenic mice: visualization of the self-renewal and multipotency of CNS stem cells. *Mol Cell Neurosci*, Vol. 17, No. 2, (February 2001), pp. (259-273), ISSN 1044-7431

- Keyoung, H. M., Roy, N. S., Benraiss, A., et al. (2001). High-yield selection and extraction of two promoter-defined phenotypes of neural stem cells from the fetal human brain. *Nat Biotechnol*, Vol. 19, No. 9, (September 2001), pp. (843-850), ISSN 1087-0156
- Kirschenbaum, B., Nedergaard, M., Preuss, A., et al. (1994). In vitro neuronal production and differentiation by precursor cells derived from the adult human forebrain. *Cereb Cortex*, Vol. 4, No. 6, (November-December 1994), pp. (576-589), ISSN 1047-3211
- Kirschenbaum, B. & Goldman, S. A. (1995). Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival of neurons arising from the adult rat forebrain subependymal zone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 92, No. 1 (January 1995), pp. (210-214), ISSN 0027-8424
- Kitada, M., Kuroda, Y. & Dezawa, M. (2011). Lectins as a tool for detecting neural stem/progenitor cells in the adult mouse brain. *Anat Rec (Hoboken)*, Vol. 294, No. 2, (February 2011), pp. (305-321), ISSN 1932-8494
- Kukekov, V. G., Laywell, E. D., Thomas, L. B., et al. (1997). A nestin-negative precursor cell from the adult mouse brain gives rise to neurons and glia. *Glia*, Vol. 21, No. 4, (December 1997), pp. (399-407), ISSN 0894-1491
- Kukekov, V. G., Laywell, E. D., Suslov, O., et al. (1999). Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Exp Neurol*, Vol. 156, No. 2, (April 1999), pp. (333-344), ISSN 0014-4886
- Laywell, E. D., Kukekov, V. G. & Steindler, D. A. (1999). Multipotent neurospheres can be derived from forebrain subependymal zone and spinal cord of adult mice after protracted postmortem intervals. *Exp Neurol*, Vol. 156, No. 2, (April 1999), pp. (430-433), ISSN 0014-4886
- Laywell, E. D., Rakic, P., Kukekov, V. G., et al. (2000). Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 97, No. 25, (December 2000), pp. (13883-13888), ISSN 0027-8424
- Leonard, B. W., Mastroeni, D., Grover, A., et al. (2009). Subventricular zone neural progenitors from rapid brain autopsies of elderly subjects with and without neurodegenerative disease. *J Comp Neurol*, Vol. 515, No. 3, (July 2009), pp. (269-294), ISSN 1096-9861
- Lim, D. A. & Alvarez-Buylla, A. (1999). Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 96, No. 13, (June 1999), pp. (7526-7531), ISSN 0027-8424
- Ling, Z. D., Potter, E. D., Lipton, J. W., et al. (1998). Differentiation of mesencephalic progenitor cells into dopaminergic neurons by cytokines. *Exp Neurol*, Vol. 149, No. 2 (February 1998), pp. (411-423), ISSN 0014-4886
- Liu, Y., Han, S. S., Wu, Y., et al. (2004). CD44 expression identifies astrocyte-restricted precursor cells. *Dev Biol*, Vol. 276, No. 1, (December 2004), pp. (31-46), ISSN 0012-1606
- Lobo, M. V., Alonso, F. J., Redondo, C., et al. (2003). Cellular characterization of epidermal growth factor-expanded free-floating neurospheres. *J Histochem Cytochem*, Vol. 51, No. 1, (January 2003), pp. (89-103), ISSN 0022-1554
- Lois, C. & Alvarez-Buylla, A. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 90, No. 5 (March 1993), pp. (2074-2077), ISSN 0027-8424

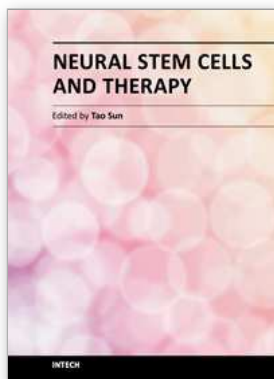
- Louis, S. A. & Reynolds, B. A. (2005). Generation and differentiation of neurospheres from murine embryonic day 14 central nervous system tissue. *Methods Mol Biol*, Vol. 290, (2005), pp. (265-280), ISSN 1064-3745
- Louis, S. A., Rietze, R. L., Deleyrolle, L., et al. (2008). Enumeration of neural stem and progenitor cells in the neural colony-forming cell assay. *Stem Cells*, Vol. 26, No. 4, (April 2008), pp. (988-996), ISSN 1549-4918
- Maric, D., Maric, I. & Barker, J. L. (1998). Buoyant density gradient fractionation and flow cytometric analysis of embryonic rat cortical neurons and progenitor cells. *Methods*, Vol. 16, No. 3, (November 1998), pp. (247-259), ISSN 1046-2023
- Maric, D., Maric, I., Chang, Y. H., et al. (2003). Prospective cell sorting of embryonic rat neural stem cells and neuronal and glial progenitors reveals selective effects of basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor on self-renewal and differentiation. *J Neurosci*, Vol. 23, No. 1, (January 2003), pp. (240-251), ISSN 1529-2401
- Martens, D. J., Tropepe, V. & van Der Kooy, D. (2000). Separate proliferation kinetics of fibroblast growth factor-responsive and epidermal growth factor-responsive neural stem cells within the embryonic forebrain germinal zone. *J Neurosci*, Vol. 20, No. 3, (February 2000), pp. (1085-1095), ISSN 1529-2401
- Mayer-Proschel, M. (2001). Isolation and generation of oligodendrocytes by immunopanning. *Curr Protoc Neurosci*, Vol. Chapter 3, No. (May 2001), pp. (Unit 3 13), ISSN 1934-8576
- McCarthy, K. D. & de Vellis, J. (1980). Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol*, Vol. 85, No. 3, (June 1980), pp. (890-902), ISSN 0021-9525
- McKinnon, R. D., Matsui, T., Dubois-Dalcq, M., et al. (1990). FGF modulates the PDGF-driven pathway of oligodendrocyte development. *Neuron*, Vol. 5, No. 5, (November 1990), pp. (603-614), ISSN 0896-6273
- Mirzadeh, Z., Merkle, F. T., Soriano-Navarro, M., et al. (2008). Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell*, Vol. 3, No. 3, (September 2008), pp. (265-278), ISSN 1875-9777
- Morshead, C. M., Reynolds, B. A., Craig, C. G., et al. (1994). Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron*, Vol. 13, No. 5, (November 1994), pp. (1071-1082), ISSN 0896-6273
- Morshead, C. M., Garcia, A. D., Sofroniew, M. V., et al. (2003). The ablation of glial fibrillary acidic protein-positive cells from the adult central nervous system results in the loss of forebrain neural stem cells but not retinal stem cells. *Eur J Neurosci*, Vol. 18, No. 1, (July 2003), pp. (76-84), ISSN 0953-816X
- Murayama, A., Matsuzaki, Y., Kawaguchi, A., et al. (2002). Flow cytometric analysis of neural stem cells in the developing and adult mouse brain. *J Neurosci Res*, Vol. 69, No. 6, (September 2002), pp. (837-847), ISSN 0360-4012
- Nakano, I., Paucar, A. A., Bajpai, R., et al. (2005). Maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) regulates multipotent neural progenitor proliferation. *J Cell Biol*, Vol. 170, No. 3, (August 2005), pp. (413-427), ISSN 0021-9525

- Nunes, M. C., Roy, N. S., Keyoung, H. M., et al. (2003). Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain. *Nat Med*, Vol. 9, No. 4, (April 2003), pp. (439-447), ISSN 1078-8956
- Palmer, T. D., Ray, J. & Gage, F. H. (1995). FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci*, Vol. 6, No. 5, (October 1995), pp. (474-486), ISSN 1044-7431
- Palmer, T. D., Takahashi, J. & Gage, F. H. (1997). The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci*, Vol. 8, No. 6, (1997), pp. (389-404), ISSN 1044-7431
- Palmer, T. D., Markakis, E. A., Willhoite, A. R., et al. (1999). Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci*, Vol. 19, No. 19, (October 1999), pp. (8487-8497), ISSN 1529-2401
- Panchision, D. M., Chen, H. L., Pistollato, F., et al. (2007). Optimized flow cytometric analysis of central nervous system tissue reveals novel functional relationships among cells expressing CD133, CD15, and CD24. *Stem Cells*, Vol. 25, No. 6 (June 2007), pp. (1560-1570), ISSN 1066-5099
- Park, S. K., Solomon, D. & Vartanian, T. (2001). Growth factor control of CNS myelination. *Dev Neurosci*, Vol. 23, No. 4-5, (2001), pp. (327-337), ISSN 0378-5866
- Pastrana, E., Cheng, L. C. & Doetsch, F. (2009). Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 106, No. 15, (April 2009), pp. (6387-6392), ISSN 1091-6490
- Piper, D. R., Mujtaba, T., Keyoung, H., et al. (2001). Identification and characterization of neuronal precursors and their progeny from human fetal tissue. *J Neurosci Res*, Vol. 66, No. 3, (November 2001), pp. (356-368), ISSN 0360-4012
- Quinones-Hinojosa, A., Sanai, N., Soriano-Navarro, M., et al. (2006). Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J Comp Neurol*, Vol. 494, No. 3, (January 2006), pp. (415-434), ISSN 0021-9967
- Reynolds, B. A., Tetzlaff, W. & Weiss, S. (1992). A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci*, Vol. 12, No. 11, (November 1992), pp. (4565-4574), ISSN 0270-6474
- Reynolds, B. A. & Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, Vol. 255, No. 5052, (March 1992), pp. (1707-1710), ISSN 0036-8075
- Reynolds, B. A. & Weiss, S. (1996). Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol*, Vol. 175, No. 1, (April 1996), pp. (1-13), ISSN 0012-1606
- Richards, L. J., Kilpatrick, T. J. & Bartlett, P. F. (1992). De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 89, No. 18, (September 1992), pp. (8591-8595), ISSN 0027-8424
- Rietze, R. L., Valcanis, H., Brooker, G. F., et al. (2001). Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature*, Vol. 412, No. 6848, (August 2001), pp. (736-739), ISSN 0028-0836
- Rietze, R. L. & Reynolds, B. A. (2006). Neural stem cell isolation and characterization. *Methods Enzymol*, Vol. 419, (2006), pp. (3-23), ISSN 0076-6879

- Rivers, L. E., Young, K. M., Rizzi, M., et al. (2008). PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. *Nat Neurosci*, Vol. 11, No. 12, (December 2008), pp. (1392-1401), ISSN 1546-1726
- Roy, N. S., Wang, S., Harrison-Restelli, C., et al. (1999). Identification, isolation, and promoter-defined separation of mitotic oligodendrocyte progenitor cells from the adult human subcortical white matter. *J Neurosci*, Vol. 19, No. 22, (November 1999), pp. (9986-9995), ISSN 1529-2401
- Roy, N. S., Benraiss, A., Wang, S., et al. (2000a). Promoter-targeted selection and isolation of neural progenitor cells from the adult human ventricular zone. *J Neurosci Res*, Vol. 59, No. 3, (February 2000), pp. (321-331), ISSN 0360-4012
- Roy, N. S., Wang, S., Jiang, L., et al. (2000b). In vitro neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. *Nat Med*, Vol. 6, No. 3, (March 2000), pp. (271-277), ISSN 1078-8956
- Rutka, J. T., Apodaca, G., Stern, R., et al. (1988). The extracellular matrix of the central and peripheral nervous systems: structure and function. *J Neurosurg*, Vol. 69, No. 2 (August 1988), pp. (155-170), ISSN 0022-3085
- Sawamoto, K., Yamamoto, A., Kawaguchi, A., et al. (2001). Direct isolation of committed neuronal progenitor cells from transgenic mice coexpressing spectrally distinct fluorescent proteins regulated by stage-specific neural promoters. *J Neurosci Res*, Vol. 65, No. 3, (August 2001), pp. (220-227), ISSN 0360-4012
- Schmandt, T., Meents, E., Gossrau, G., et al. (2005). High-purity lineage selection of embryonic stem cell-derived neurons. *Stem Cells Dev*, Vol. 14, No. 1 (February 2005), pp. (55-64), ISSN 1547-3287
- Schwartz, P. H., Bryant, P. J., Fuja, T. J., et al. (2003). Isolation and characterization of neural progenitor cells from post-mortem human cortex. *J Neurosci Res*, Vol. 74, No. 6, (December 2003), pp. (838-851), ISSN 0360-4012
- Seaberg, R. M. & van der Kooy, D. (2002). Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. *J Neurosci*, Vol. 22, No. 5, (March 2002), pp. (1784-1793), ISSN 1529-2401
- Shi, J., Marinovich, A. & Barres, B. A. (1998). Purification and characterization of adult oligodendrocyte precursor cells from the rat optic nerve. *J Neurosci*, Vol. 18, No. 12, (June 15 1998), pp. (4627-4636), ISSN 0270-6474
- Suh, H., Consiglio, A., Ray, J., et al. (2007). In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2⁺ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*, Vol. 1, No. 5, (November 2007), pp. (515-528), ISSN 1934-5909
- Sun, J., Zhou, W., Ma, D., et al. (2010). Endothelial cells promote neural stem cell proliferation and differentiation associated with VEGF activated Notch and Pten signaling. *Dev Dyn*, Vol. 239, No. 9, (September 2010), pp. (2345-2353), ISSN 1097-0177
- Svendsen, C. N., Fawcett, J. W., Bentlage, C., et al. (1995). Increased survival of rat EGF-generated CNS precursor cells using B27 supplemented medium. *Exp Brain Res*, Vol. 102, No. 3, (1995), pp. (407-414), ISSN 0014-4819
- Svendsen, C. N., Caldwell, M. A., Shen, J., et al. (1997a). Long-term survival of human central nervous system progenitor cells transplanted into a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol*, Vol. 148, No. 1, (November 1997), pp. (135-146), ISSN 0014-4886

- Svendsen, C. N., Skepper, J., Rosser, A. E., et al. (1997b). Restricted growth potential of rat neural precursors as compared to mouse. *Brain Res Dev Brain Res*, Vol. 99, No. 2, (April 1997), pp. (253-258), ISSN 0165-3806
- Svendsen, C. N., ter Borg, M. G., Armstrong, R. J., et al. (1998). A new method for the rapid and long term growth of human neural precursor cells. *J Neurosci Methods*, Vol. 85, No. 2, (December 1998), pp. (141-152), ISSN 0165-0270
- Tan, F. C., Lee, K. H., Gouk, S. S., et al. (2007). Optimization of cryopreservation of stem cells cultured as neurospheres: comparison between vitrification, slow-cooling and rapid cooling freezing protocols. *Cryo Letters*, Vol. 28, No. 6, (November-December 2007), pp. (445-460), ISSN 0143-2044
- Thompson, L. H., Andersson, E., Jensen, J. B., et al. (2006). Neurogenin2 identifies a transplantable dopamine neuron precursor in the developing ventral mesencephalon. *Exp Neurol*, Vol. 198, No. 1, (March 2006), pp. (183-198), ISSN 0014-4886
- Tropepe, V., Sibilio, M., Ciruna, B. G., et al. (1999). Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev Biol*, Vol. 208, No. 1, (April 1999), pp. (166-188), ISSN 0012-1606
- Uchida, N., Buck, D. W., He, D., et al. (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 97, No. 26, (December 2000), pp. (14720-14725), ISSN 0027-8424
- Vescovi, A. L., Reynolds, B. A., Fraser, D. D., et al. (1993). bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron*, Vol. 11, No. 5, (November 1993), pp. (951-966), ISSN 0896-6273
- Von Visger, J. R., Yeon, D. S., Oh, T. H., et al. (1994). Differentiation and maturation of astrocytes derived from neuroepithelial progenitor cells in culture. *Exp Neurol*, Vol. 128, No. 1, (July 1994), pp. (34-40), ISSN 0014-4886
- Walton, N. M., Sutter, B. M., Chen, H. X., et al. (2006). Derivation and large-scale expansion of multipotent astroglial neural progenitors from adult human brain. *Development*, Vol. 133, No. 18, (September 2006), pp. (3671-3681), ISSN 0950-1991
- Wang, S., Roy, N. S., Benraiss, A., et al. (2000). Promoter-based isolation and fluorescence-activated sorting of mitotic neuronal progenitor cells from the adult mammalian ependymal/subependymal zone. *Dev Neurosci*, Vol. 22, No. 1-2, (2000), pp. (167-176), ISSN 0378-5866
- Wang, S., Chandler-Militello, D., Lu, G., et al. (2010). Prospective identification, isolation, and profiling of a telomerase-expressing subpopulation of human neural stem cells, using sox2 enhancer-directed fluorescence-activated cell sorting. *J Neurosci*, Vol. 30, No. 44, (November 2010), pp. (14635-14648), ISSN 1529-2401
- Weiss, S., Dunne, C., Hewson, J., et al. (1996). Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci*, Vol. 16, No. 23, (December 1 1996), pp. (7599-7609), ISSN 0270-6474
- Wilson, H. C., Onischke, C. & Raine, C. S. (2003). Human oligodendrocyte precursor cells in vitro: phenotypic analysis and differential response to growth factors. *Glia*, Vol. 44, No. 2, (November 2003), pp. (153-165), ISSN 0894-1491
- Windrem, M. S., Roy, N. S., Wang, J., et al. (2002). Progenitor cells derived from the adult human subcortical white matter disperse and differentiate as oligodendrocytes

- within demyelinated lesions of the rat brain. *J Neurosci Res*, Vol. 69, No. 6, (September 2002), pp. (966-975), ISSN 0360-4012
- Windrem, M. S., Nunes, M. C., Rashbaum, W. K., et al. (2004). Fetal and adult human oligodendrocyte progenitor cell isolates myelinate the congenitally dysmyelinated brain. *Nat Med*, Vol. 10, No. 1, (January 2004), pp. (93-97), ISSN 1078-8956
- Wright, A. P., Fitzgerald, J. J. & Colello, R. J. (1997). Rapid purification of glial cells using immunomagnetic separation. *J Neurosci Methods*, Vol. 74, No. 1, (June 6 1997), pp. (37-44), ISSN 0165-0270
- Wu, C., Chang, A., Smith, M. C., et al. (2009). Beta4 tubulin identifies a primitive cell source for oligodendrocytes in the mammalian brain. *J Neurosci*, Vol. 29, No. 24, (June 2009), pp. (7649-7657), ISSN 1529-2401
- Xu, Y., Kimura, K., Matsumoto, N., et al. (2003). Isolation of neural stem cells from the forebrain of deceased early postnatal and adult rats with protracted post-mortem intervals. *J Neurosci Res*, Vol. 74, No. 4, (2003), pp. (533-540), ISSN 1097-4547
- Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J. D., et al. (1991). Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell*, Vol. 64, No. 4, (February 1991), pp. (841-848), ISSN 0092-8674
- Yoshida, N., Hishiyama, S., Yamaguchi, M., et al. (2003). Decrease in expression of alpha 5 beta 1 integrin during neuronal differentiation of cortical progenitor cells. *Exp Cell Res*, Vol. 287, No. 2, (July 2003), pp. (262-271), ISSN 0014-4827
- Young, G. M. & Levison, S. W. (1997). An improved method for propagating oligodendrocyte progenitors in vitro. *J Neurosci Methods*, Vol. 77, No. 2, (December 1997), pp. (163-168), ISSN 0165-0270
- Yuan, X., Chittajallu, R., Belachew, S., et al. (2002). Expression of the green fluorescent protein in the oligodendrocyte lineage: a transgenic mouse for developmental and physiological studies. *J Neurosci Res*, Vol. 70, No. 4, (November 2002), pp. (529-545), ISSN 0360-4012
- Zigler, J. S., Jr., Lepe-Zuniga, J. L., Vistica, B., et al. (1985). Analysis of the cytotoxic effects of light-exposed HEPES-containing culture medium. *In Vitro Cell Dev Biol*, Vol. 21, No. 5, (May 1985), pp. (282-287), ISSN 0883-8364



Neural Stem Cells and Therapy

Edited by Dr. Tao Sun

ISBN 978-953-307-958-5

Hard cover, 440 pages

Publisher InTech

Published online 15, February, 2012

Published in print edition February, 2012

This book is a collective work of international experts in the neural stem cell field. The book incorporates the characterization of embryonic and adult neural stem cells in both invertebrates and vertebrates. It highlights the history and the most advanced discoveries in neural stem cells, and summarizes the mechanisms of neural stem cell development. In particular, this book provides strategies and discusses the challenges of utilizing neural stem cells for therapy of neurological disorders and brain and spinal cord injuries. It is suitable for general readers, students, doctors and researchers who are interested in understanding the principles of and new discoveries in neural stem cells and therapy.

How to reference

In order to correctly reference this scholarly work, feel free to copy and paste the following:

Jorge Oliver-De la Cruz and Angel Ayuso-Sacido (2012). Neural Stem Cells from Mammalian Brain: Isolation Protocols and Maintenance Conditions, Neural Stem Cells and Therapy, Dr. Tao Sun (Ed.), ISBN: 978-953-307-958-5, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/neural-stem-cells-and-therapy/neural-stem-cells-from-mammalian-brain-isolation-protocols-and-maintenance-conditions>

INTech
open science | open minds

InTech Europe

University Campus STeP Ri
Slavka Krautzeka 83/A
51000 Rijeka, Croatia
Phone: +385 (51) 770 447
Fax: +385 (51) 686 166
www.intechopen.com

InTech China

Unit 405, Office Block, Hotel Equatorial Shanghai
No.65, Yan An Road (West), Shanghai, 200040, China
中国上海市延安西路65号上海国际贵都大饭店办公楼405单元
Phone: +86-21-62489820
Fax: +86-21-62489821

Caracterización molecular de células progenitoras del parénquima subcortical cerebral humano adulto

Molecular characterization of progenitor cells from subcortical parenchyma of adult human brain

Oliver-De La Cruz J¹, Carrión-Navarro J¹, Romaguera-Ros M¹, Gutiérrez-Martín A², Escobedo-Lucea C¹, Ayuso-Sacido A¹, García-Verdugo JM¹

¹ Laboratorio de Morfología Celular, Unidad Mixta Centro de Investigación Príncipe Felipe y Universidad de Valencia, CIBERNED, Valencia. ² Departamento de Neurocirugía, Hospital Universitario La Fe de Valencia. Valencia. España.

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

Resumen

Objetivo: Caracterizar los patrones de expresión de marcadores de indiferenciación y diferenciación y las alteraciones morfológicas de las células progenitoras procedentes de parénquima cerebral humano adulto a lo largo de los pases en cultivo, evaluando su potencial para ser empleadas como fuente de progenitores de oligodendrocitos.

Materiales y Métodos: Las células progenitoras se aislaron a partir de dos muestras obtenidas de pacientes sometidos a exéresis temporal por epilepsia. Para comprobar la evolución de los niveles de expresión de marcadores moleculares de diferenciación e indiferenciación en dichas células, se procedió a la extracción de ARNm en cada pase y a su estudio mediante RT-PCR. Se llevó a cabo un análisis de su capacidad proliferativa mediante inmunocitoquímica y un estudio de la evolución morfológica mediante microscopía.

Resultados: Las células mostraron capacidad proliferativa durante los primeros pases en cultivo. Además, detectamos la expresión de marcadores de indiferenciación y diferenciación temprana a oligodendrocitos.

Conclusión: Las células progenitoras aisladas de parénquima subcortical de cerebro humano pueden ser susceptibles de diferenciación a oligodendrocitos maduros, aunque en protocolos de diferenciación sólo deberían utilizarse pases tempranos.

Palabras clave:

Oligodendrocitos, regeneración, cerebro, epilepsia.

Abstract

Objective: characterize the behavior of progenitor cells isolated from subcortical parenchyma of human brain in culture. We have analyzed the changes in expression patterns of differentiation/undifferentiation markers as well as cell morphology along the passages and evaluated the potential to be further used as oligodendrocyte progenitors source.

Material and Methods: We isolated progenitor cells from two different samples of subcortical parenchyma human brain of patients suffering from epilepsy. Cells were kept in culture until they became quiescent/senescent. Every other passages RNAs were isolated and checked for the expression of differentiation and undifferentiation markers by using RT-PCR. Proliferation was also addressed by RT-PCR and immunocytochemistry. We carried out cell morphology studies on semithin and ultrathin sections of cells.

Results: We observed decreasing proliferative capacity of both two cell lines which became quiescent/senescent around passages 8-10. We detected the expression of either undifferentiation or early neural and oligodendrocytes differentiation markers.

Conclusions: As for the expression of molecular markers, progenitor cells isolated from subcortical parenchyma of human brain have the potential to differentiate into mature oligodendrocytes.

Key words:

Oligodendrocyte, Regeneration, brain, epilepsy.

Correspondencia

A. Ayuso-Sacido, PhD
Dpto. de Morfología Celular. Centro de Investigación Príncipe Felipe.
Avda. Autopista del Saler 16. 46012, Valencia (Spain)
aayuso@cipf.es

Introducción

Un número importante de enfermedades neurodegenerativas que afectan al sistema nervioso central, cursan con pérdida de mielina. Dentro de este grupo de patologías, la esclerosis múltiple (EM) es, con excepción de los traumatismos, la causa más frecuente de discapacidad neurológica en adultos jóvenes [1][2]. La evolución normal de la enfermedad, junto con la observación de remielinización espontánea en lesiones inflamatorias agudas en animales de experimentación [3], hacen de la EM una de las enfermedades neurológicas candidatas para la utilización de tratamientos alternativos basados en terapia celular [4-6]. Varios tipos celulares podrían ser candidatos para implantarse en las placas escleróticas [6]. Pueden obtenerse oligodendrocitos mielinizantes por diferenciación de células madre embrionarias, progenitores de oligodendrocitos de origen fetal, células de Schwann aisladas a través de biopsias de nervios periféricos, glía olfatoria, células madre neurales (NSC) o progenitoras adultas procedentes de la zona subventricular de los ventrículos laterales y progenitores de oligodendrocitos (OPC) que aparecen dispersos en la sustancia blanca del cerebro adulto [7-11]. En este sentido, las NSC y progenitoras adultas de cerebro humano son la opción más prometedora. Idealmente, procederían del propio sujeto, con lo que se evitaría además el rechazo inmunológico. Sin embargo, el principal problema con estos tipos celulares es disponer de un número de células suficientes para llevar a cabo los protocolos de expansión y diferenciación *in vitro*, previos a la reimplantación en el paciente. Además, es crítico poder identificar por medio de marcadores moleculares, los distintos estadios en el proceso de diferenciación hacia oligodendrocitos maduros y el contexto en el que estos eventos tienen lugar.

Trabajos previos [3][12][13] han demostrado que las células progenitoras procedentes del parénquima subcortical del cerebro humano adulto son capaces, inmediatamente después de ser aisladas, de diferenciarse a oligodendrocitos maduros y pueden sobrevivir y cobrar funcionalidad cuando son trasplantados en el cerebro de pequeños mamíferos. Dichas células son también capaces de proliferar *in vitro* durante periodos de tiempo prolongados, incluso después de haber sido criopreservadas y descongeladas, conservando su potencial para generar células que expresan marcadores neuronales [9][10]. A pesar de ello, se desconoce cuanto tiempo pueden mantenerse estas células en cultivo, así como su potencial de diferenciación a oligodendrocitos maduros. En el presente trabajo, demostramos que la capacidad proliferativa de células progenitoras de parénquima cerebral humano adulto subcultivadas *in vitro* disminuye hasta su entrada en quiescencia/senescencia en torno a pa-

ses 8-10. Del mismo modo, detectamos una reducción paulatina en la expresión de marcadores de indiferenciación y diferenciación temprana de oligodendrocitos a lo largo de los pases en cultivo, lo que es indicativo de su pérdida de potencial para generar oligodendrocitos maduros.

Materiales y métodos

Recogida de las muestras y procesado.

Las muestras de sustancia blanca fueron obtenidas de la exéresis hipocampal de dos pacientes epilépticos, que no mostraban evidencia de tumoración cerebral ni extracerebral, procedentes del Hospital La Fe, de Valencia, previo consentimiento informado. El estudio fue aprobado por la Comisión de Ética del Hospital La Fe de Valencia.

Las muestras fueron procesadas antes de las 6 horas siguientes a la extracción, siguiendo el protocolo [10] resumido en la Figura 1.

Cultivo celular

Las células obtenidas fueron resuspendidas en un medio definido compuesto por DMEM-F12, amino ácidos no esenciales (100 μ M), hepes (2 mM), D-Glucosa (30 mM) BSA (0,001%), sodio-piruvato (1mM), L-glutamina (2 mM), N2 suplemento (1X), penicilina-estreptomicina-fungizona (1X) (Gibco-Invitrogen) e hidrocortisona (300 ng/ml) y tri-iodo-tironina (30 ng/ml) (Sigma). Los medios se suplementaron con bFGF (basic fibroblast growth factor) (10 ng/ml, Sigma) y EGF (epidermal growth factor) (10 ng/ml) (Sigma).

Cuando las células alcanzaban un crecimiento cercano a la confluencia, se procedía al subcultivo incubando con Triple Express (Invitrogen) durante 5 minutos a 37°C, se recogían y eran sembradas a una densidad de 2.000 células/cm² en frascos de 25 cm². Las células fueron subcultivadas, mediante este procedimiento, hasta su entrada en quiescencia/senescencia, lo cual ocurría entre los pases 8 y 10. En este sentido, consideramos pases tempranos del 1 al 5 y pases tardíos a partir del pase 5. El tiempo estimado entre pases, específico de cada muestra y de la densidad celular, oscilaba entre 15 y 30 días.

Extracción de ARN, síntesis de ADNc y ensayos de PCR.

Parte de las células obtenidas tras cada pase se destinó a la extracción de RNA con el RNeasy micro Kit® (QUIAGEN®), seguido de un tratamiento posterior con DNase I (QUIAGEN®). A continuación, se realizó la síntesis de ADNc utilizando el High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit® (Applied Biosystems®). Utilizando el progra-

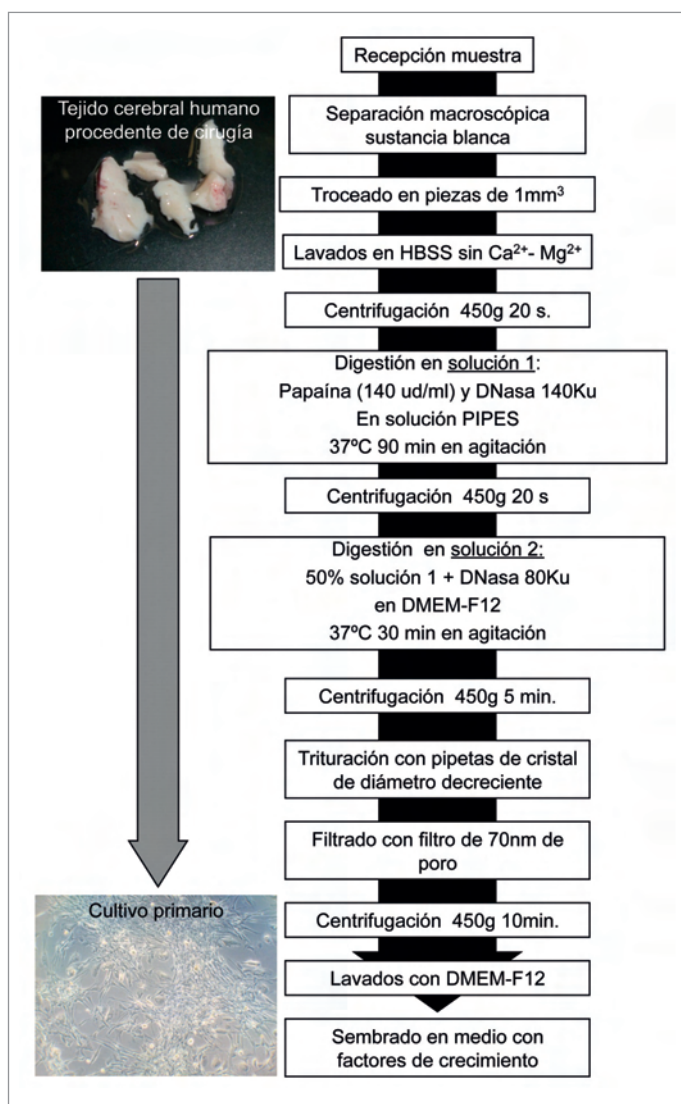


Fig. 1. Protocolo de aislamiento de células madre/precursoras neurales a partir de tejido cerebral humano.

ma Primer3 se diseñaron cebadores específicos para los distintos componentes de las rutas moleculares implicadas en diferenciación de oligodendrocitos, así como marcadores de indiferenciación y diferenciación hacia otras células de linaje neural. Tras comprobar la eficiencia y especificidad de los cebadores utilizando los controles adecuados en cada caso, se realizaron los ensayos de PCR (Paq5000 DNA Polymerase, Stratagene®) empleando ADNc procedentes de distintos pases. Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en gel de Agarosa al 1,8%.

Inmunocitoquímica

Para comprobar el porcentaje de células en proliferación y su evolución, se realizó una tinción inmunocitoquímica

contra el marcador Ki67. Las células de ambas muestras para pases altos y bajos, se sembraron en placas recubiertas con poli-D-lisina y fueron mantenidas hasta alcanzar el 80% de confluencia. Posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4%. Se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) 0,1M y se procedió a la recuperación del antígeno mediante tampón citrato sódico 10 mM a pH 6. Después se incubaron 30 minutos en tampón de bloqueo (Triton 0,2%, suero de cabra al 5% en PBS 0'1M) y posteriormente se dejaron toda la noche con el anticuerpo primario (anti-Ki67 1:250, Dako). Al día siguiente, tras varios lavados en PBS 0,1M, se incubaron con anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 (1:500, Molecular Probes, Invitrogen) durante hora y media. Los núcleos se tiñeron con DAPI y las placas se montaron con ProLong Gold antifade reagent (Molecular Probes, Invitrogen). Se tomaron 10 fotografías correspondientes a 10 campos elegidos al azar dentro de cada pocillo y se analizaron un mínimo de 3 pocillos. Posteriormente se realizó un recuento de células totales y células Ki67+ en los campos seleccionados. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células positivas con respecto al total de células.

Microscopía electrónica de transmisión

Tras su siembra, las células fueron fijadas con 3% de glutaraldehído en tampón fosfato (PB) 0,1M durante 30 minutos a temperatura ambiente y postfijadas en 2% de tetraóxido de osmio durante 2 horas. Tras un proceso de deshidratación se incluyeron en Araldita (Durcupan, Fluka). Se realizaron cortes semifinos de 1 µm y se tiñeron con azul de toluidina (Panreac, España) al 1%. Las fotografías se tomaron en un microscopio Nikon Eclipse 800. Posteriormente, a partir de los cortes semifinos se realizaron cortes ultrafinos (70nm) con una cuchilla de diamante, se tiñeron con citrato de plomo, y fueron examinados usando un microscopio electrónico modelo FEI Tecnai Spirit, con el fin de establecer posibles semejanzas y diferencias entre los pases más tempranos y tardíos de ambas líneas de cultivos primarios.

Resultados

Caracterización morfológica de las células progenitoras in vitro

Durante los primeros días de su siembra, los cultivos obtenidos presentaron un gran número de células diferenciadas sin capacidad proliferativa. Al cabo de una semana se observaron poblaciones clonales con capacidad proliferativa. Estas células presentan una morfología alargada con escaso citoplasma, núcleos grandes, cromatina laxa y nucleo-

los prominentes (Figura 2). Además, mostraron abundante citoesqueleto y ocasionales fibras de estrés y vesículas claras al microscopio electrónico (Figura 2). Durante los primeros pases no observamos diferencias significativas entre las dos muestras analizadas. A medida que aumentaron los pases en cultivo observamos un aumento paulatino de la relación citoplasma/núcleo (Figura 2). Además, aparecieron invaginaciones nucleares y un considerable aumento de fibras de estrés y vesículas claras. Estos cambios en la morfología fueron apreciables en pases más tempranos en la muestra 2.

Descenso de la tasa proliferativa a lo largo de los pases

El procesamiento de las muestras de sustancia blanca subcortical de cerebro humano adulto permitieron la obtención de

dos líneas celulares que fueron mantenidas en cultivo durante más de un año, incluyendo periodos de criopreservación mediante congelación en medio con DMSO.

La observación apuntó un descenso de la tasa proliferativa in vitro, de forma que en los pases altos, partiendo del mismo número de células iniciales, era necesario más tiempo para alcanzar una confluencia total, llegando un pase en el cual el cultivo entraba en quiescencia/senescencia y no progresaba.

Con objeto de cuantificar la evolución de la capacidad proliferativa de dichas células a lo largo de los pases en cultivo, se efectuó un análisis de la presencia de Ki67 mediante inmunocitoquímica (Figura 3). El recuento de células positivas indicó un descenso estadísticamente significativo en el porcentaje de células que seguían en fases activas del ciclo

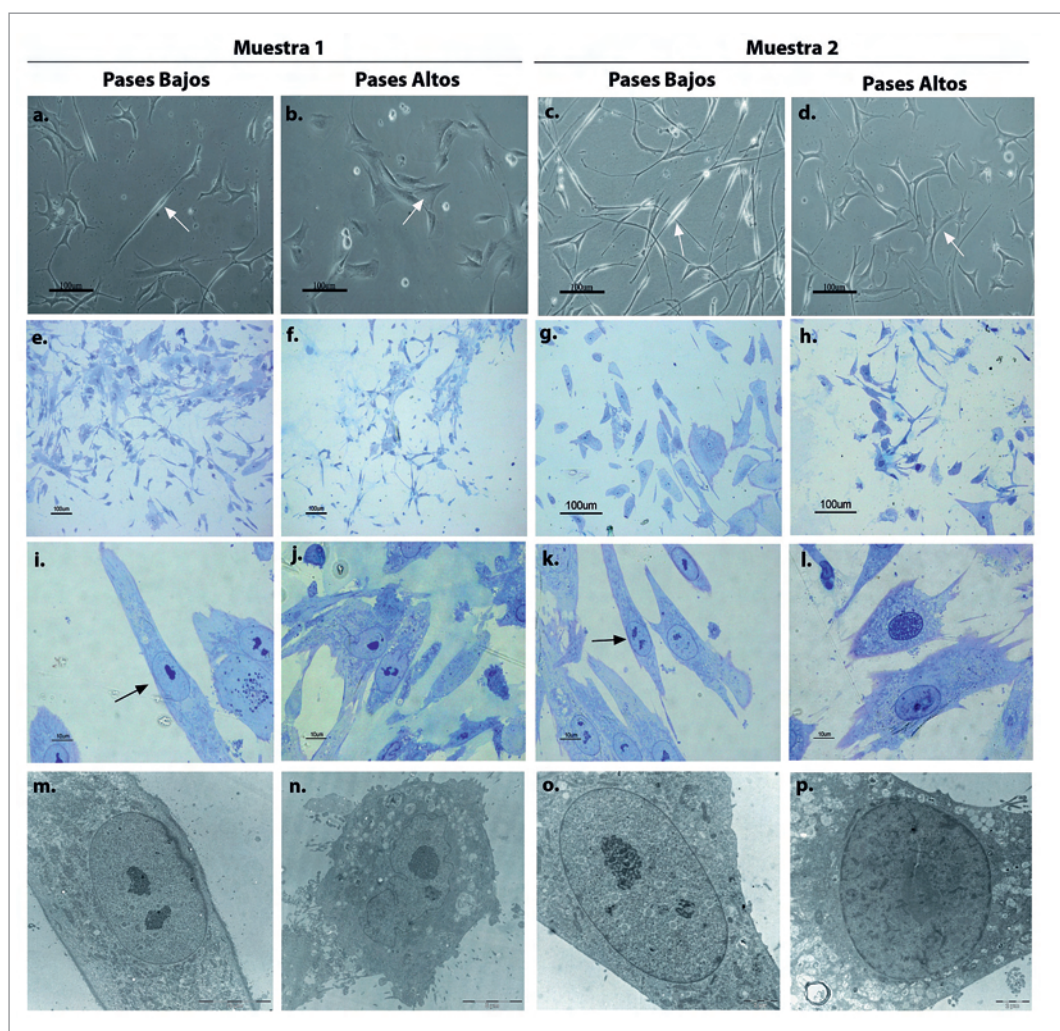


Fig. 2. Análisis morfológico de células progenitoras aisladas del parénquima subcortical durante los diferentes pases en cultivo hasta alcanzar la senescencia. Comparación entre pases bajos y pases altos de los dos cultivos. Microscopía óptica, durante su crecimiento in vitro (a-d, barra de escala = 100µm), en cortes semifinos (azul de toluidina) (e-h, barra de escala = 100µm) y (i-l, barra de escala = 10µm). Cortes ultrafinos en microscopio electrónico de transmisión (m-p) (m, barra de escala = 10µm; n, barra de escala = 6µm; n-p, barra de escala = 2µm).

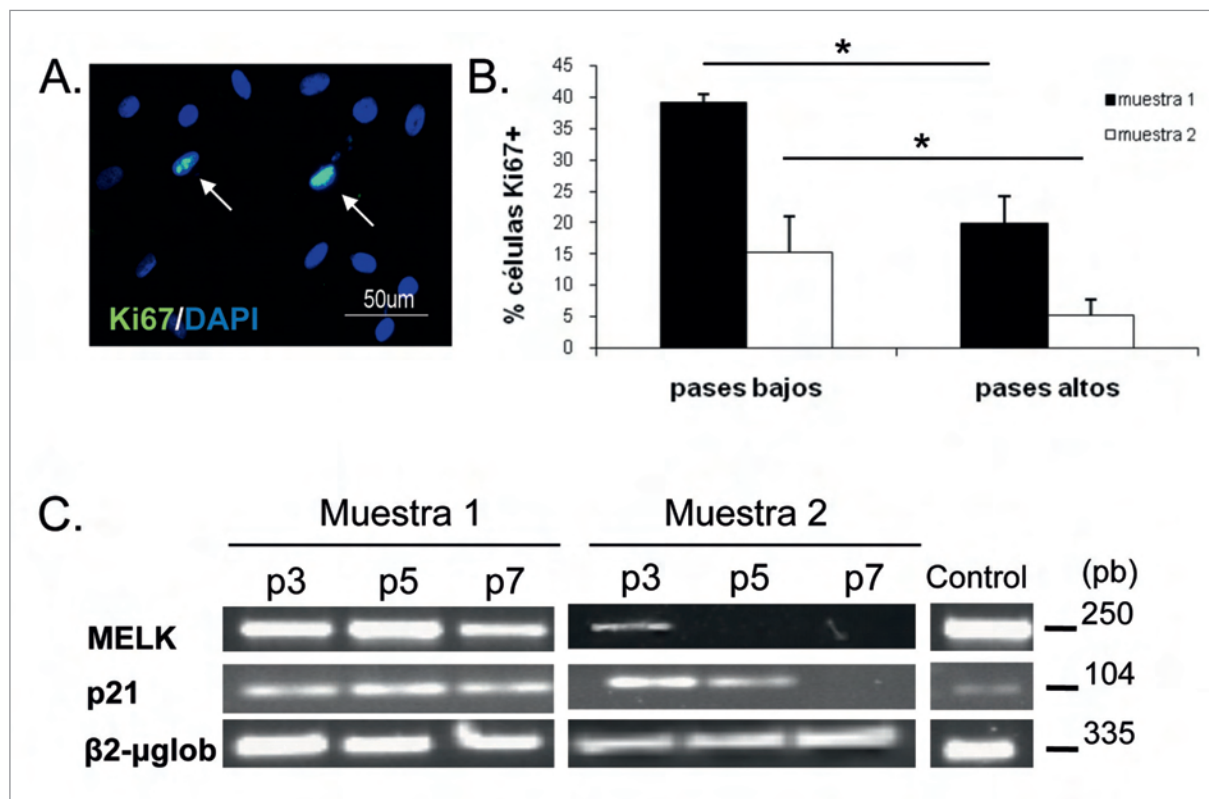


Fig. 3. Cuantificación de la capacidad proliferativa de células progenitoras aisladas del parénquima subcortical. A. Inmunocitoquímica contra Ki67 (flechas blancas: células positivas para Ki67). B. Histograma de células positivas para Ki67 según pases en cultivo. C. Análisis de expresión de los marcadores de proliferación p21 y MELK a lo largo de los 7 primeros pases en cultivo.

celular a lo largo de los pases, tanto para la muestra 1 ($39,3\% \pm 1,24$ para pases bajos frente a $19,9\% \pm 4,34$ para pases altos) como para la muestra 2 ($15,3\% \pm 5,67$ para pases bajos frente a $5,2\% \pm 2,54$ para pases altos) (Figura 3).

Con el mismo objetivo, se comprobó la presencia de marcadores de ciclo celular mediante RT-PCR. El empleo de esta técnica permitió detectar una pérdida de expresión del marcador Ki67 en ambas muestras, así como un descenso en la expresión de MELK. Además, en la muestra 2 se detectó una disminución de expresión de p21. Sin embargo, no se observaron cambios importantes en la expresión de otros marcadores como ciclina D1 (datos no mostrados) (Figura 3).

Pérdida de los marcadores de indiferenciación a lo largo de los pases

Con objeto de estudiar la identidad de las células proliferativas aisladas del parénquima subcortical de cerebro humano, diseñamos una colección de cebadores específicos para marcadores de indiferenciación de células madre neuronales y progenitores previamente descritos en la bibliografía tanto durante el desarrollo neural como en el cerebro

adulto. Aislamos ARNm procedente de las muestras cada dos pases en cultivo y estudiamos la expresión de dichos marcadores mediante RT-PCR. Observamos la presencia de ABCG2, Bmi-1, Nestina, Vimentina y Sox2 en ambas muestras, lo que confirmaba la existencia de una población de progenitores neurales en ellas. Así mismo, estudiamos la expresión de Musashi-1 (MSI1), Notch-1 y Nogina. Durante el desarrollo temprano del sistema nervioso MSI1 promueve la salida del ciclo celular y la diferenciación neuronal bloqueando la gliogénesis [14, 15], mientras que Notch está implicado en el mantenimiento de células madre neuronales y gliogénesis, [16, 17]. En este caso, observamos niveles altos de Notch y más reducidos de MSI1. Los niveles de expresión de Nogina fueron muy bajos en la muestra 1 y casi indetectables en la muestra 2. Finalmente, ampliamos el estudio de expresión a otros marcadores detectados previamente en progenitores neurales que podían aportarnos más información sobre la identidad de nuestras células. Así pues, encontramos altos niveles de expresión de CD44, niveles más bajos de CD90 y expresión muy débil en el caso de CD133, siendo casi indetectable en la muestra 2. En todos los casos los niveles de expresión de los marcadores

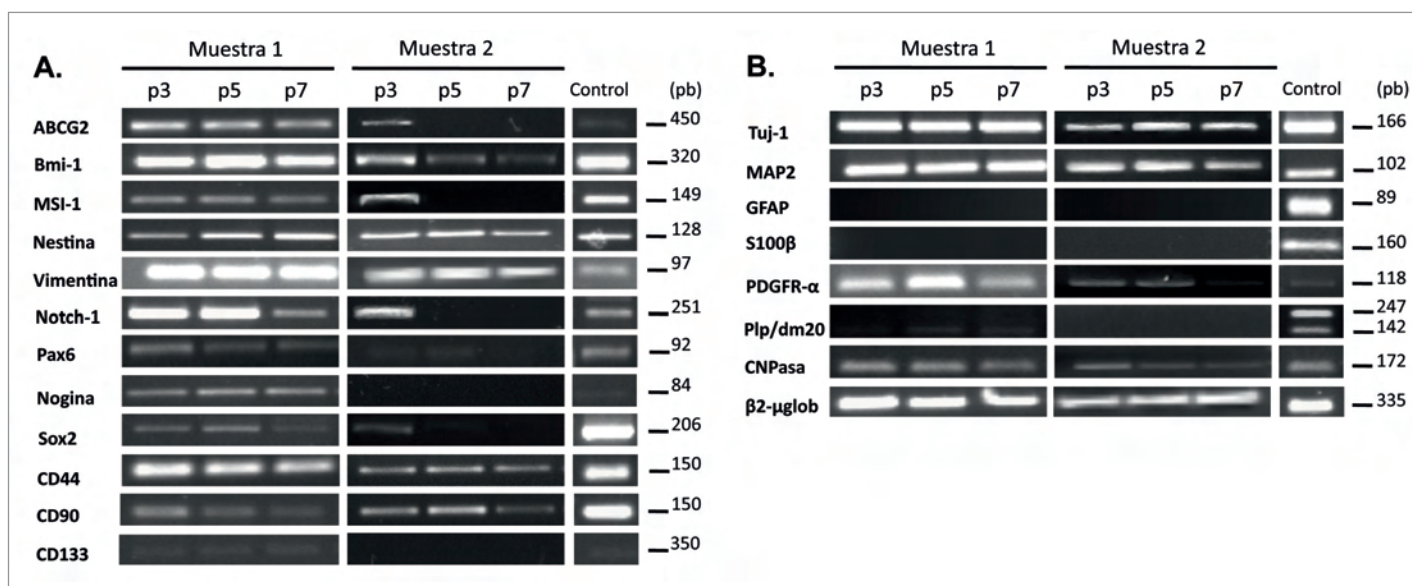


Fig. 4. Diferencias en los niveles de expresión de marcadores moleculares mediante RT-PCR durante el cultivo (A. Marcadores de indiferenciación. B. Marcadores de diferenciación a células neuronales, astrocitos y oligodendrocitos).

analizados se reducían en mayor o menor medida, con el aumento de los pases en cultivo. Este efecto era mucho más dramático en el caso de la muestra 2 (Figura 4).

Las células progenitoras obtenidas del parénquima subcortical expresan marcadores de linaje neuronal y oligodendroglial.

A continuación, nos preguntamos si la entrada en quiescencia/senescencia en pases altos podría ser consistente con una diferenciación de las células proliferativas. Para contestar a esta pregunta, realizamos un análisis de expresión de marcadores moleculares específicos de neurona, astrocitos y oligodendrocitos mediante RT-PCR a lo largo de todos los pases en cultivo hasta que se observaba el arresto de la proliferación en los cultivos.

En las dos muestras analizadas no se detectó la expresión de ninguno de los dos marcadores específicos de astrocitos utilizados en el estudio (GFAP y S100B). Sin embargo, ambas muestras presentaron niveles de expresión altos tanto de beta III tubulina como de MAP2, que no cambiaron significativamente a lo largo de los pases en cultivo (Figura 4).

Con respecto a la expresión de marcadores específicos del linaje oligodendroglial, ambas muestras presentaban el marcador de progenitores de oligodendrocitos PDGFR α , aunque sus niveles disminuían ligeramente a lo largo de los pases. Observamos además una tímida expresión de DM20 en la muestra 1, ausente en la muestra 2. Cuando estudiamos la expresión de marcadores tempranos en la diferenciación a oligodendrocitos, quedó evidenciada la presencia

de CNPase en las dos muestras, que disminuía conforme aumentaban los pases (Figura 4). Sin embargo, no se detectó la expresión de los factores de transcripción Olig1 y Olig2, necesarios para la diferenciación oligodendroglial, ni de marcadores correspondientes a estadios finales de la diferenciación a oligodendrocitos maduros como MAG, MOG o MBP (datos no mostrados).

Discusión

Los resultados derivados del presente trabajo confirman la identidad de las células aisladas a partir de parénquima subcortical de cerebro humano como progenitores neurales [10]. Se ha postulado que dicha población de células progenitoras podría ser utilizada como fuente de oligodendrocitos en futuras terapias celulares de patologías desmielinizantes. Sin embargo, incrementar el número de células es fundamental para el éxito de cualquier terapia. En el presente estudio planteamos determinar el número máximo de pases que dichas células pueden permanecer en cultivo. Tal como se desprende de los resultados del presente trabajo, nuestra población celular no crece durante un número de pases elevados. Por el contrario, las células entran en quiescencia o senescencia entre los pases 8 y 10. El estudio morfológico indica que este proceso de arresto progresivo o de pérdida de la capacidad de división, vaya acompañado de una diferenciación estructural de la célula, con alteraciones nucleares, incremento de fibras de estrés y acúmulo de vesículas. En este sentido, las diferencias observadas entre las dos muestras pueden ser debidas tanto a

la localización específica dentro del cerebro del paciente como al manejo de las mismas.

Las células de ambas muestras presentaban expresión de marcadores descritos previamente en células madre neuronales, tanto de origen fetal como adultas, tales como Bmi, Sox-2, Nestin, Vimentina, ABCG2, CD90 y CD44 y niveles muy bajos de CD133, lo que confirmaba la presencia de poblaciones celulares progenitoras neurales.

Los niveles de expresión de todos estos marcadores disminuyen a medida que aumentan los pases en cultivo. Sin embargo, en las células procedentes de la muestra 2, la caída en la expresión de los mismos fue más acentuada y tuvo lugar en pases más bajos. El progresivo descenso de expresión de marcadores de indiferenciación, junto con la pérdida de la capacidad multipotente, a lo largo de los pases en cultivo, se ha descrito previamente en células procedentes de cerebro fetal [18] y postmortem [19, 20].

Posteriormente analizamos la expresión de Musashi-1, Notch y Nogina. Durante el desarrollo temprano del sistema nervioso Musashi 1 (MSI1), junto con Ngns, promueve la salida del ciclo celular y la diferenciación neuronal, activando entre otros NeuroD y Matc3, bloqueando la gliogénesis [14][15]. Por otro lado, Notch está implicado en el mantenimiento de células madre neuronales y gliogénesis, y durante el desarrollo de mamíferos, se encuentra expresado en las zonas ventricular y subventricular, así como en neuroesferas en cultivo [16][17]. En un modelo murino con médula espinal dañada, células madre procedente de tejido fetal que sobre expresaban Nogina, fueron capaces de aumentar ligeramente la diferenciación neuronal y oligodendroglial [21]. Así pues la expresión de dichos marcadores puede influir significativamente en la determinación preferencial de progenitores neurales hacia linajes específicos.

Nosotros observamos que MSI1 se expresa en todos los pases de la muestra 1 y en los primeros pases de la muestra 2, y lo mismo ocurre con la expresión de Notch-1, aunque con niveles de expresión significativamente más elevados. Además hay una expresión moderada de Nogina en la muestra 1, prácticamente ausente en la muestra 2.

Cuando estudiamos la expresión de marcadores de diferenciación vimos la presencia de células que expresaban marcadores tempranos neuronales y oligodendrogliales. Sin embargo no pudieron detectarse marcadores específicos de astrocitos.

Ambos resultados sugieren la presencia de subclones dentro de nuestra población con diferente potencial para generar precursores neuronales y oligodendrogliales. La existencia de heterogeneidad es frecuente en poblaciones aisladas de tejido nervioso fetal y adulto [20][22].

Así pues, el análisis molecular junto con los estudios morfológicos, nos han permitido determinar la presencia de progenitores neurales y comprobar la existencia de varias subpoblaciones celulares, dentro del cultivo primario obtenido de las diferentes muestras, con distinto potencial para dar lugar a progenitores neurales y oligodendrogliales. Además hemos demostrado que dichas células presentan una capacidad de proliferación limitada en cultivo, con presencia de marcadores de indiferenciación durante los primeros pases en cultivo. Todo ello indica que la utilización de células progenitoras, aisladas de parénquima subcortical de muestras frescas de cerebro humano, puede ser un modelo inigualable para el estudio de los mecanismos de diferenciación desde progenitores de oligodendrocitos presentes en el cerebro humano adulto hasta oligodendrocitos maduros. Estos estudios nos ayudaran en el futuro a entender mejor el comportamiento de progenitores adultos *in vivo* e intentar modularlo en situaciones patológicas. ■

Agradecimientos

Al departamento de neurocirugía del Hospital la Fe de Valencia. Jorge Oliver de la Cruz es becario del programa FPU del Ministerio de Sanidad. Miriam Romaguera-Ros está contratada a cargo del programa de ayudas de FUNDACIÓN MAPFRE. El proyecto ha sido financiado en parte por FUNDACIÓN MAPFRE y por la Fundación Alicia Koplowitz.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pflieger CC, Flachs EM, Koch-Henriksen N. Social consequences of multiple sclerosis: clinical and demographic predictors - a historical prospective cohort study. *Eur J Neurol* 2010.
2. Koch-Henriksen N, Sorensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol* 2010; 9:520-32.
3. Scolding NJ, Franklin RJ. Remyelination in demyelinating disease. *Baillieres Clin Neurol* 1997; 6:525-48.
4. Zhao C, Zawadzka M, Roulois AJ, Bruce CC, Franklin RJ. Promoting remyelination in multiple sclerosis by endogenous adult neural stem/precursor cells: Defining cellular targets. *J Neurol Sci* 2008; 265:12-6.
5. Goldman SA, Lang J, Roy N, Schanz SJ, Sim FS, Wang S, et al. Progenitor cell-based myelination as a model for cell-based therapy of the central nervous system. *Ernst Schering Res Found Workshop* 2006; 60:195-213.

6. Rice C, Halfpenny C, Scolding N. Cell therapy in demyelinating diseases. *NeuroRx* 2004; 1:415-23.
7. Radtke C, Spies M, Sasaki M, Vogt PM, Kocsis JD. Demyelinating diseases and potential repair strategies. *Int J Dev Neurosci* 2007; 25:149-53.
8. Windrem MS, Nunes MC, Rashbaum WK, Schwartz TH, Goodman RA, McKhann G et al. Fetal and adult human oligodendrocyte progenitor cell isolates myelinate the congenitally dysmyelinated brain. *Nat Med* 2004; 10: 93-7.
9. Greenfield JP, Ayuso-Sacido A, Schwartz TH, Pannullo H, Souweidane M, Stieg PE et al. Use of human neural tissue for the generation of progenitors. *Neurosurgery*. 2008; 62: 21-37.
10. Ayuso-Sacido A, Roy NS, Schwartz TH, Greenfield JP, Bockvar JA. Long-term expansion of adult human brain subventricular zone precursors. *Neurosurg*. 2008; 62: 223-9.
11. Rice CM, Scolding NJ. Adult stem cells for the treatment of neurological disease. *Methods Mol Biol*. 2009; 549: 17-32.
12. Roy NS, Wang S, Harrison-Restelli C, Benraiss A, Fraser RA, Gravel M et al. Identification, isolation, and promoter-defined separation of mitotic oligodendrocyte progenitor cells from the adult human subcortical white matter. *J Neurosci*. 1999; 19: 9986-95.
13. Scolding NJ, Rayner PJ, Sussman J, Shaw J, Compston DA. A proliferative adult human oligodendrocyte progenitor. *Neuroreport*. 1995; 6: 441-5.
14. Farah MH, Olson JM, Sucic HB, Hume RI, Tapscott SJ, Turner DL. Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells. *Development*. 2000; 127: 693-702.
15. Nieto M, Schuurmans C, Britz O, Guillemot F. Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron* 2001; 29: 401-13.
16. Corbin JG, Gaiano N, Juliano SL, Poluch S, Stancik E, Haydar TF. Regulation of neural progenitor cell development in the nervous system. *J Neurochem*. 2008; 106: 2272-87.
17. Irvin DK, Zurcher SD, Nguyen T, Weinmaster G, and Kornblum HI. Expression patterns of Notch1, Notch2, and Notch3 suggest multiple functional roles for the Notch-DSL signaling system during brain development. *J Comp Neurol* 2001; 436: 167-81.
18. Tamak S, Eckert K, He D, Sutton R, Doshe M, Jain G et al. Engraftment of sorted/expanded human central nervous system stem cells from fetal brain. *J Neurosci Res*. 2002; 69: 976-86.
19. Palme TD, Schwartz PH, Taupin P, Kaspar B, Stein SA, Gage FH. Cell culture. Progenitor cells from human brain after death. *Nature*. 2001; 411: 42-3.
20. Schwartz PH, Bryant PJ, Fuja TJ, Su H, O'Dowd DK, Klassen H. Isolation and characterization of neural progenitor cells from post-mortem human cortex. *J Neurosci Res*. 2003; 74: 838-51.
21. Setoguchi T, Nakashima K, Takizawa T, Yanagisawa M, Ochiai W, Okabe M et al. Treatment of spinal cord injury by transplantation of fetal neural precursor cells engineered to express BMP inhibitor. *Exp Neurol*. 2004; 189: 33-44.
22. Imura T, Kornblum HI, Sofroniew MV. The predominant neural stem cell isolated from postnatal and adult forebrain but not early embryonic forebrain expresses GFAP. *J Neurosci*. 2003; 23: 2824-32.

Conflicto de intereses

Los autores hemos recibido ayuda económica de FUNDACIÓN MAPFRE para la realización de este trabajo. No hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial o de FUNDACIÓN MAPFRE.